

Björn Simm

Zelluläre Wirkungen von Prostaglandin E₂
und Prostaglandin D₂ auf periphere und
zentralnervöse Strukturen des
Thermoregulationssystems der Ratte

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



edition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2017

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2017

© 2017 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition linguistique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie und –Biochemie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Joachim Roth

**Zelluläre Wirkungen von Prostaglandin E₂ und Prostaglandin D₂ auf
periphere und zentralnervöse Strukturen des
Thermoregulationssystems der Ratte**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

Björn Simm

Tierarzt aus Bremen

Gießen 2016

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Joachim Roth
Prof. Dr. Andreas Moritz

Tag der Disputation: 11.11.2016

Meinen Eltern

Abkürzungen

15-d-PGJ ₂	15-deoxy-delta(12, 14)-prostaglandin J2
3V	dritter Ventrikel
AA	Arachidonsäure
ac	<i>Commissura anterior</i>
ANOVA	Varianzanalyse
AP	<i>Area Postrema</i>
ARW	Anregungswellenlänge
ATPase	Adenosintriphosphatase
AV3V	anteroventrale Wand des dritten Ventrikels
BAT	braunes Fettgewebe
BHS	Blut-Hirn-Schranke
Ca ²⁺	Calcium
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cc	<i>Corpus callosum</i>
CD14	<i>Cluster of differentiation 14</i>
COX	Zyklooxygenase
cPGES	zytosolische Prostaglandin E Synthase
CSF	Cerebrospinalflüssigkeit
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol Dilaktat
DMH	dorsomedialer Hypothalamus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DP	Prostaglandin D ₂ Rezeptor
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
DRG	Spinalganglion
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

Abkürzungen

EP	Prostaglandin E ₂ Rezeptor
FKS	fetales Kälberserum
GABA	γ -Aminobuttersäure
GBSS	<i>Gey's Balanced Salt Solution</i>
Glut	Glutamat
H-PGDS	hämatopoetische Prostaglandin D Synthase
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure
IL	Interleukin
IP3	Inositol-Triphosphat
K ⁺	Kalium
LBP	Lipopolysaccharid bindendes Protein
LPB	lateraler parabrachialer Nukleus
L-PGDS	Lipocalin Prostaglandin D Synthase
LPS	Lipopolysaccharid
LV	lateraler Ventrikel
ME	<i>Eminentia mediana</i>
MnPO	<i>Nucleus medianus praeopticus</i>
MPA	medianes präoptisches Areal
mPGES	mikrosomale Prostaglandin E Synthase
mRNA	messenger RNA
MTT	3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid
Na ⁺	Natrium
NBA	Neurobasal-A

Abkürzungen

NF- κ B	<i>Nuclear Factor kappa B</i>
NL	Hypophysenvorderlappen
NSAID	Nicht-steroidale anti-inflammatorische Medikamente
och	<i>Chiasma opticum</i>
OVL	<i>Organum vasculosum laminae terminalis</i>
PACAP	Hypophysen-Adenylatzyklase-aktivierendes Polypeptid
PAMP	Pathogen-assoziierte Molekülstruktur
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PG	Prostaglandin
PGD ₂	Prostaglandin D ₂
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGES	Prostaglandin E Synthase
PGS	Prostaglandin-Synthase
PIN	Pinealorgan
PKC	Proteinkinase C
PLA ₂	Phospholipase A ₂
POA	präoptische Region
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren
RNA	Ribonukleinsäure
RPa	<i>Nucleus raphe pallidus</i>
SCO	Subcommissuralorgan
SFO	Subfornikalorgan

Abkürzungen

TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TRP	<i>Transient receptor potential</i>
TX	Thromboxan
ZNS	Zentralnervensystem

INHALT

A. Einleitung	1
B. Literaturübersicht	4
1. Bildung und Funktionen von PGE ₂ im Organismus	4
1.1. Synthese von PGE ₂ und PGD ₂	5
1.2. Besonderheiten der PGE ₂ -Synthese im Gehirn.....	8
1.3. Physiologische Aufgaben von PGE ₂ und PGD ₂	9
1.4. Rezeptoren für PGE ₂ und PGD ₂	10
1.5. Die zentrale Bedeutung von PGE ₂ für die Fieberentstehung.....	12
2. Funktionelle Neuroanatomie des Thermoregulationssystems.....	14
2.1. Periphere Thermosensoren.....	16
2.2. Das zentrale thermoafferente System	18
2.3. Thermosensitive und thermointegrative Strukturen im Bereich des anterioren Hypothalamus.....	19
2.4. Efferente Bahnen vom Hypothalamus zu den Effektororganen	19
2.5. Die Aktivität des Thermoregulationssystem unter thermoneutralen Bedingungen.....	22
2.6. Die Aktivität des Thermoregulationssystem unter Kältebelastung	22
2.7. Mögliche Angriffspunkte für PGE ₂	23
3. Signalwege zur Fieberentstehung.....	24
3.1. Der humorale Signalweg.....	24
3.1.1. Exogene und endogene Pyrogene.....	25
3.1.2. Der Transport des Fiebersignals über die Blut-Hirn-Schranke	28
3.2. Der nervale Signalweg.....	31
3.2.1. Die Rolle des <i>Nervus vagus</i>	31
3.2.2. Evidenz für eine Beteiligung weiterer sensorischer Afferenzen (<i>N. trigeminus</i> , Afferenzen von Hautnerven).....	32

4. Zellkultur als Alternative zum Tierversuch	33
C. Eigene Untersuchungen	36
1. Publikation 1: Prostaglandin D ₂ modulates calcium signals induced by prostaglandin E ₂ in neurons of rat dorsal root ganglia	36
2. Publikation 2: Effects of prostaglandin E ₂ on cells cultured from the rat <i>organum vasculosum laminae terminalis</i> and median preoptic nucleus	54
D. Material und Methoden	88
1. Material	88
1.1. Geräte	88
1.2. Ge- und Verbrauchsmaterial	91
1.2.1. Allgemein	91
1.2.2. Tierhaltung	92
1.2.3. Zellkultur und Calcium-Imaging	92
1.2.4. Immunzytochemie	93
1.2.5. TNF- α und IL-6 Bioassays	94
1.3. Chemikalien und Substanzen	94
1.4. Software	96
2. Versuchstiere	96
3. Methoden	97
3.1. Primäre Zellkultur	97
3.1.1. Primäre neurogliale Zellkultur des <i>Nucleus medianus praeopticus</i> (MnPO) und des <i>Organum vasculosum laminae terminalis</i> (OVLT)	99
3.1.2. Etablierung einer primären neuroglialen Zellkultur der Spinalganglien (Dorsal Root Ganglion / DRG)	103
3.2. Ca ²⁺ -Ratio Imaging Technik: Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration	107
3.2.1. Grundlagen der Ca ²⁺ -Ratio Imaging Technik	107
3.2.2. Lösungen und Puffer	110

3.2.3.	Messstand	111
3.2.4.	Versuchsvorbereitung	112
3.2.5.	Versuchsdurchführung.....	114
3.2.6.	Messprotokolle	116
3.2.7.	Datenevaluierung und Statistik.....	120
3.3.	Immunzytochemie.....	122
3.3.1.	Grundlagen der Immunzytochemie	122
3.3.2.	Lösungen und Puffer	124
3.3.3.	Antikörper.....	124
3.3.4.	Versuchsprotokoll.....	126
3.3.5.	Mikroskopie und Auswertung	127
3.4.	Zytokin Bioassays: IL-6 und TNF- α	127
3.4.1.	Grundlage	127
3.4.2.	Lösungen und Puffer	128
3.4.3.	Probengewinnung	129
3.4.4.	IL-6 Assay	130
3.4.5.	TNF- α Assay	130
3.4.6.	Auswertung und Statistik.....	131
E.	Erweiterte Diskussion	132
1.	Die Beeinflussung peripherer Kältesensoren durch PGE ₂	132
2.	Die Modulation der PGE ₂ -vermittelten Beeinflussung peripherer Kältesensoren durch PGD ₂	135
3.	Direkte Reaktivität des OVLT gegenüber PGE ₂	136
4.	Modulation der Stärke Glutamat-induzierter Ca ²⁺ -Signale in Neuronen des MnPO durch PGE ₂	139
5.	Modulation der LPS-induzierten Produktion von Zytokinen durch PGE ₂ in Kulturen des OVLT und des MnPO.....	141
F.	Zusammenfassung	144

G. Summary	146
H. Literatur	148
I. Anhang.....	179
1. Danksagung.....	179
2. Erklärung zur Dissertation	180

A. EINLEITUNG

Das Thermoregulationssystem der Säugetiere setzt sich aus insgesamt 5 Komponenten zusammen. Thermosensoren, die in der Haut und im Zentralnervensystem (ZNS) lokalisiert sind, dienen der Detektion von Temperaturänderungen in der Körperperipherie und im Körperkern. Im afferenten Teil leiten die Axone der Thermosensoren diese Information über periphere Nerven zunächst zum Rückenmark und über den in der weißen Substanz des Rückenmarks lokalisierten *Tractus spinothalamicus lateralis* zum Gehirn weiter. Verarbeitet wird die thermische Information in spezifischen Neuronenverbänden des vorderen Hypothalamus. Der efferente Teil zieht wiederum in Form von Axonen zunächst zum Hirnstamm und von dort zum Rückenmark, um über vegetative und somatomotorische Efferenzen die zur Thermoregulation genutzten Organe anzusteuern, welche auch als Effektororgane oder Thermoeffektoren bezeichnet werden. Hierzu gehören Blutgefäße (Vasokonstriktion bzw. Vasodilatation), braunes Fettgewebe („zitterfreie Wärmebildung“), Skelettmuskulatur (Kältezittern), Schweißdrüsen bzw. Zunge und obere Atemwege (evaporative Wärmeabgabe: Schwitzen, Hecheln).

Beim Fieber handelt es sich um eine vom Organismus selbst induzierte Veränderung innerhalb dieses Regelsystems, die sehr häufig im Rahmen von Infektionen, Entzündungsprozessen, Tumorerkrankungen oder Gewebeschädigungen beobachtet wird (Roth und Blatteis 2014). Hierbei ist die Temperatur im Körperkern erhöht, wobei diese Erhöhung aktiv durch den Einsatz der erwähnten Effektororgane eingestellt wird. Diese Temperaturerhöhung wird durch den Einfluss von fiebererzeugenden Substanzen („Pyrogenen“) auf die neuronalen Strukturen des Thermoregulationssystems hervorgerufen. In den meisten Fällen ist Prostaglandin E₂ (PGE₂) an der Fieberentstehung beteiligt (Milton 1998). Der Wirkmechanismus vieler fiebersenkender oder fieberunterdrückender Medikamente beruht auf der Hemmung der Synthese von PGE₂ (Botting 2004). Wie PGE₂ die neuronalen Komponenten des Thermoregulationssystems auf zellulärer Ebene so beeinflusst, dass sich eine Fieberreaktion entwickeln kann, ist im Vergleich zu den *in vivo* beschriebenen Effekten weit weniger gut untersucht. Zwei Voraussetzungen sind hierbei unabdingbar. Zum einen müssen die beteiligten neuroanatomischen Strukturen klar definiert sein. Diese Voraussetzung wurde im Verlauf der letzten 10 Jahre durch eine Reihe von sehr eleganten Studien am Gesamtorganismus

erfüllt. So wurden die afferenten Verbindungen zwischen peripheren Thermosensoren und den regulierenden präoptisch-hypothalamischen Neuronenverbänden im Detail aufgeklärt (Nakamura und Morrison 2008a). Im Bereich des anterioren Hypothalamus wurde der *Nucleus medianus praeopticus* (MnPO) nicht nur als essenzielle Zielstruktur des afferenten Schenkels des Thermoregulationssystems, sondern auch als zentraler Auslöser zur Ausbildung einer Fieberreaktion identifiziert (Lazarus et al. 2007; Nakamura und Morrison 2011; Saper et al. 2012; Yoshida et al. 2003). Die neuronale Aktivierung der thermoregulatorisch relevanten Neurone des MnPO erfolgt durch den Neurotransmitter Glutamat (Morrison und Nakamura 2011; Nakamura und Morrison 2008b). Als Wirkmechanismus zur Auslösung von Kälteabwehrreaktionen oder Fieber wird eine Stimulation hemmender GABAerger (γ -Aminobuttersäure) Neurone angesehen, was zu einer Enthemmung der Wärmebildungs- und -konservierungsreaktionen führt (Nakamura und Morrison 2011). In unmittelbarer Nachbarschaft des MnPO ist das *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT) lokalisiert. Das OVLT gehört zu den wenigen Hirnstrukturen mit unvollständiger Blut-Hirn-Schranke, sodass zirkulierende inflammatorische Signalmoleküle -inklusive PGE_2 -direkten Zugang zum Ort der Fieberentstehung erhalten können. Dem OVLT wird traditionell eine wichtige Bedeutung als Eintrittspforte für fiebererzeugende Substanzen in das Gehirn zugesprochen (Roth et al. 2004). Auch zur molekularen Physiologie der peripheren Thermosensoren sind markante Erkenntnisfortschritte zu verzeichnen. So scheint es, dass ein weiter Bereich physiologischer Hauttemperaturen durch eine Familie von Kationenkanälen detektiert wird, die TRP-Kanäle (*transient receptor potential*-Kanäle) genannt werden. Der zu dieser Familie gehörende TRPM8 wurde als wichtigster Kältesensor der Haut identifiziert, der Kanal wird nicht nur bei Abkühlung, sondern auch durch Menthol aktiviert (McKemy et al. 2002; Peier et al. 2002). Einige frühere Untersuchungen aus unserer Arbeitsgruppe (Ross et al. 2000; Rummel et al. 2005) hatten Hinweise darauf ergeben, dass sich die fiebererzeugende Wirkung von PGE_2 zu einem gewissen Anteil auch durch Effekte auf periphere Kältesensoren manifestieren könnte.

Die zweite Voraussetzung zur Untersuchung zellulärer Effekte von PGE_2 auf die genannten thermoregulatorisch relevanten neuronalen Strukturen liegt in der Verfügbarkeit von Primärkulturen eben dieser Strukturen. Derartige Primärkulturen wurden im Rahmen vorangehender Untersuchungen für MnPO (Bastos-Pereira et al. 2014; Hatzelmann et al. 2013) und OVLT (Ott et al. 2010) bereits erfolgreich eingesetzt.

Die Primärkultur der Zellkörper der peripheren Kältesensoren (Neurone der Spinalganglien) wurde im Rahmen dieser Arbeit etabliert.

Die zentralen Ziele und Fragestellungen der vorgelegten Dissertationsschrift können wie folgt umrissen werden.

- Gibt es Evidenz dafür, dass periphere kaltsensitive Neurone auch durch PGE₂ aktiviert werden können?
- Kann die Reaktion peripherer kaltsensitiver Neurone auf PGE₂ durch das antipyretisch und anti-inflammatorisch wirksame Eicosanoid PGD₂ moduliert werden?
- Kann PGE₂ in Primärkulturen des OVLT (Struktur mit unvollständiger Blut-Hirn-Schranke) und des MnPO (zentrale Schaltstelle für Thermoregulation und Fieber) direkte zelluläre Reaktionen induzieren?
- Lässt sich die Antwort von (möglicherweise GABAergen) MnPO-Neuronen auf Glutamat durch PGE₂ modulieren?
- Wirkt sich eine Exposition von OVLT- und MnPO-Kulturen mit PGE₂ bzw. PGD₂ auf die Kapazität dieser Hirnstrukturen zur Bildung inflammatorischer und fiebererzeugender Zytokine aus?

B. LITERATURÜBERSICHT

1. Bildung und Funktionen von PGE₂ im Organismus

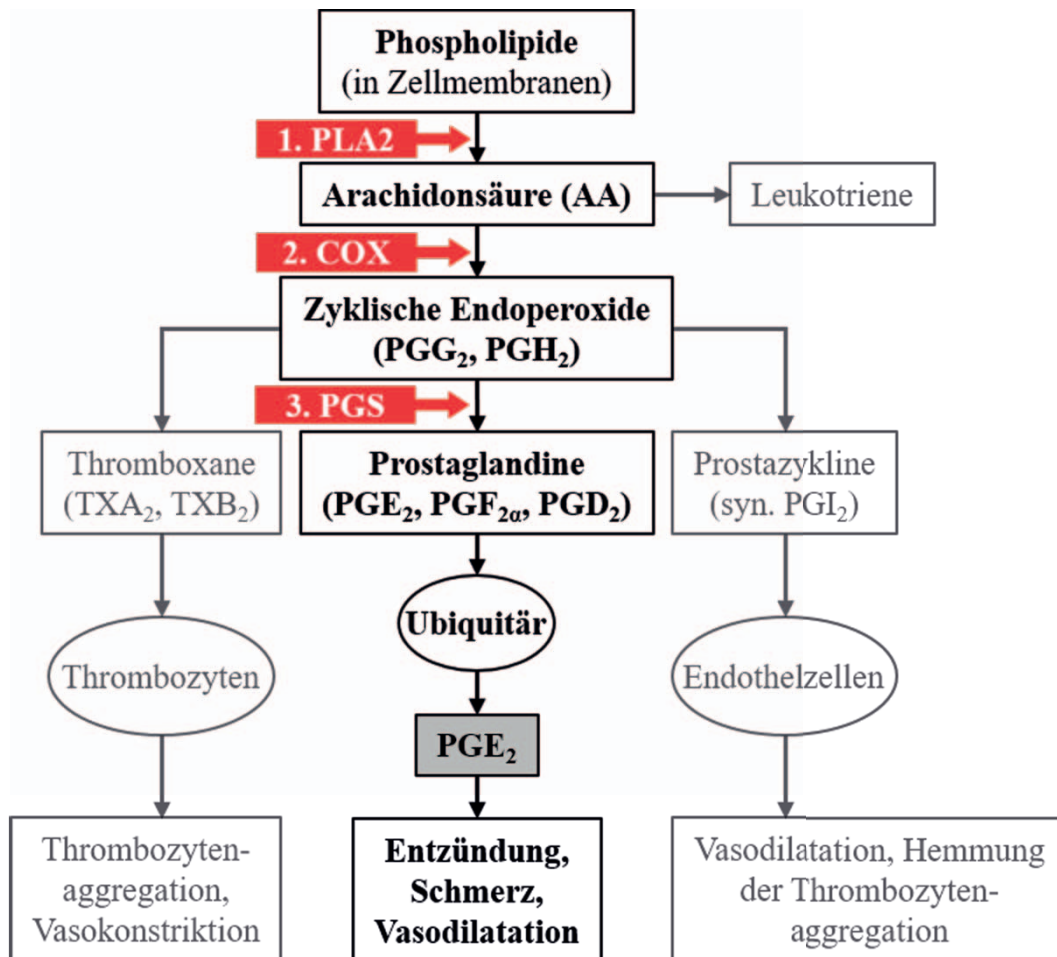


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Wege, die zur Bildung von Eicosanoiden (Prostaglandinen, Leukotrienen, Prostazyklinen und Thromboxanen) führen.

Exemplarisch sind auch Bildungsorte und biologische Wirkungen angegeben. Die Beschreibung von Prostaglandin E₂ erfolgt in Abschnitt 1.1 (verändert nach Rummel 2005).

Abkürzungen: PLA₂ = Phospholipase A₂; COX = Zyklooxygenase; PGS = Prostaglandin-Synthase; AA = Arachidonsäure; PG = Prostaglandin; TX = Thromboxan.

Prostaglandine werden zusammen mit Thromboxanen, Prostazyklinen und Leukotrienen unter dem Oberbegriff Eicosanoide zusammengefasst (Harizi et al. 2008). Es handelt sich hierbei um Derivate der Arachidonsäure, einer mehrfach ungesättigten Fettsäure aus 20 Kohlenstoffatomen. Diese liegt in veresterter Form als Bestandteil von Zellmembranen vor. Eicosanoide steuern im tierischen Organismus zahlreiche biologische Prozesse, sind

demzufolge als Botenstoffe bzw. Signalmoleküle anzusehen. Aufgrund ihrer geringen Halbwertszeit müssen Eicosanoide in den Geweben, in denen sie ihre Wirkung entfalten, stets neu gebildet werden. Diese Neubildung erfolgt in mehreren enzymatisch katalysierten Schritten (Abbildung 1).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden bestimmte Wirkungen der Prostaglandine PGE₂ und PGD₂ experimentell untersucht. Daher soll im Folgenden auf Leukotriene, Thromboxane und Prostazykline nicht näher eingegangen werden.

1.1. Synthese von PGE₂ und PGD₂

Die Biosynthese von PGE₂ erfolgt in 3 sequentiellen Schritten. Zunächst wird Arachidonsäure durch eine Phospholipase A₂ (PLA₂) aus Lipiden von Zellmembranen freigesetzt (Murakami et al. 1997; Smith et al. 1991). Bei PLA₂ handelt es sich nicht um ein Enzym, sondern eher um eine Enzymfamilie mit mehr als 12 Mitgliedern (Kudo und Murakami 2002). Die beiden wichtigsten Untergruppen der PLA₂-Familie werden als zytosolische (c) und sekretorische (s) PLA₂ bezeichnet (Murakami und Kudo 2001). Ein Mitglied der cPLA₂-Subfamilie wird für die Bildung von PGE₂ und anderen Prostaglandinen (PGs) unter inflammatorischen Bedingungen als besonders relevant angesehen. Hierbei handelt es sich um cPLA₂- α . Unter Normalbedingungen ist dieses Enzym im Zytosol nachweisbar; nach inflammatorischer Stimulation erfolgen Phosphorylierung und eine anschließende Translokation zum Golgi-Apparat bzw. zum endoplasmatischen Retikulum, wo sich auch die weiteren PGE₂-synthetisierenden Enzyme befinden (Ivanov und Romanovsky 2004; Kudo und Murakami 2002). Der Kontakt von phosphorylierter cPLA₂- α mit intrazellulären Membranen führt zur Freisetzung von Arachidonsäure. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass durch Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) eine Hochregulierung von cPLA₂- α auf mRNA-Ebene induziert wird (Dieter et al. 2002; Ivanov et al. 2002). Außerdem ist in Immunzellen von cPLA₂- α defizienten (*knockout*) Mäusen eine verminderte Bildung von PGs beschrieben worden (Uozumi und Shimizu 2002). In Einklang mit dieser Beobachtung steht eine weitere Studie, in der eine pharmakologische Hemmung der cPLA₂- α bei Mäusen eine LPS-induzierte Lungenentzündung abschwächen konnte (Nagase et al. 2003). Unter Bedingungen einer systemischen oder lokalisierten

Entzündungsreaktion könnte cPLA₂- α somit eine wichtige Rolle bei der Initiierung der Synthese von PGE₂ (und anderen PGs) spielen.

Auch einem Mitglied der sPLA₂-Subfamilie wurde eine Bedeutung für die PG-Synthese unter entzündlichen Bedingungen zugesprochen; hierbei handelt es sich um die sPLA₂-IIA (Ivanov und Romanovsky 2004; Nakano und Arita 1990). Die sPLA₂ wird in den Extrazellularraum abgegeben, um dort AA aus dem Außenblatt der Zellmembran zu mobilisieren. Bei Versuchstieren und Patienten konnte während systemischer Entzündungsreaktionen ein erhöhter Serumspiegel von sPLA₂-IIA nachgewiesen werden (Bulger und Maier 2000; Vadas und Pruzanski 1993). Nach Stimulation mit LPS erfolgt eine Hochregulierung der Expression dieses Enzyms (Ivanov et al. 2002; Nakano und Arita 1990). Es bleibt also festzuhalten, dass zur Induktion des ersten Schritts der PG-Synthese unter inflammatorischen Bedingungen sowohl cPLA₂- α als auch sPLA₂-IIA beitragen können.

Der zweite Schritt zur PG-Synthese beinhaltet eine zweifache Umwandlung der freigesetzten AA mittels enzymatischer Aktivitäten, die eine Zykllooxygenierung und eine Peroxidaseaktivität beinhalten. Beide Reaktionen werden durch ein und dasselbe Enzym katalysiert, das die Bezeichnung Zykllooxygenase (COX) erhalten hat (Simmons et al. 2004). Aufgrund der Tatsache, dass als Endprodukt der enzymatischen Umwandlung der freigesetzten Arachidonsäure PGH₂ entsteht (Abbildung 1), wurde das Enzym ursprünglich auch PGH-Synthase genannt (Ivanov und Romanovsky 2004). Bereits 1972 wurde postuliert, dass es mehr als eine COX geben müsse (Flower und Vane 1972; Smith und Lands 1972). In der Tat gibt es zwei gut charakterisierte Isoformen dieses Enzyms, die als COX-1 und COX-2 bezeichnet werden (Ivanov und Romanovsky 2004; Simmons et al. 2004; Smith et al. 2000b). Später wurde noch eine weitere Isoform kloniert, die als Variante der COX-1 die Bezeichnung COX-1b oder auch COX-3 erhalten hat (Chandrasekharan et al. 2002). Auf COX-3 soll hier jedoch nicht weiter eingegangen werden. COX-1 und COX-2 weisen eine Sequenzhomologie von ca. 60% auf und beide Enzymformen katalysieren dieselbe Reaktion, sie werden jedoch unterschiedlich reguliert und haben sehr verschiedene biologische Funktionen (Smith et al. 2000b). In zahlreichen Geweben wird COX-1 konstitutiv exprimiert, wo dieses Enzym bzw. Produkte seiner Aktivität eine Reihe physiologischer Prozesse unterstützen oder steuern (siehe Abschnitt 1.3). Obwohl in einzelnen Untersuchungen eine Induktion von COX-1 durch Mitogene oder Wachstumsfaktoren beschrieben wurde, wird dieses Enzym generell als „resistent“

gegenüber transkriptioneller Hochregulierung angesehen; speziell inflammatorische Stimuli führen nicht zu einer erhöhten Expression von COX-1 (Ivanov und Romanovsky 2004). Im Gegensatz zu COX-1 ist das Transkript von COX-2 unter basalen Bedingungen in den meisten Geweben / Organen kaum nachweisbar, wird jedoch durch inflammatorische Stimuli massiv hochreguliert (Damm et al. 2012; Ivanov et al. 2002; Schneiders et al. 2015; Wu et al. 1995). Dies betrifft neben verschiedenen peripheren Organen wie Leber und Milz und den dort lokalisierten Immunzellen besonders das Gehirn, wo Endothelzellen als Hauptort der inflammatorischen COX-2-Induktion charakterisiert wurden (Matsumura und Kobayashi 2004; Roth und Blatteis 2014; Steiner et al. 2006; Vasilache et al. 2015). In diesen und zahlreichen anderen Studien wurde daher eine stark erhöhte COX-2 Expression für die stimulierte Bildung von PGE₂ unter inflammatorischen Bedingungen verantwortlich gemacht. Eine direkte Messung der inflammatorisch induzierten COX-2-Expression als direktes Maß für eine hieraus resultierende Steigerung der PGE₂-Synthese scheint jedoch eine zu vereinfachte Sicht dieser Zusammenhänge zu sein (Ivanov und Romanovsky 2004). Vielmehr muss hierbei auch der dritte und letzte Schritt der PG-Bildung berücksichtigt werden.

Der finale Schritt zur PG-Synthese wird von so bezeichneten PG-Synthasen katalysiert. Je nachdem ob PGE₂ oder PGD₂ als Endprodukt durch Umwandlung aus PGH₂ entsteht, werden diese als PGE₂-Synthasen bzw. PGD₂-Synthasen bezeichnet (Urade et al. 1995) (Abbildung 2). Es gibt zwei Formen der PGD-Synthase, den Lipocalin- und den hämatopoetischen Typ des Enzyms (L-PGDS und H-PGDS) (Joo und Sadikot 2012). H-PGDS findet man in diversen Immunzellen, während L-PGDS unter anderem für die Bildung von PGD₂ im Gehirn zuständig ist (Joo und Sadikot 2012). Eine besondere Bedeutung kommt neben PGD₂ selbst auch seinem Metaboliten 15-deoxy-delta(12, 14)-prostaglandin J₂ (15-d-PGJ₂) zu (Bos et al. 2004) (Abbildung 2).

Bei den PGE-Synthasen unterscheidet man zwischen zytosolischen und mikrosomalen Formen des Enzyms (cPGES und mPGES) (Ivanov et al. 2002). Expressionsuntersuchungen zeigten, dass cPGES funktionell mit COX-1 gekoppelt ist, während mPGES, speziell mPGES-1, mit COX-2 eine Funktionseinheit bildet (Dieter et al. 2000). So ist es nicht erstaunlich, dass mPGES-1 (ähnlich wie COX-2) durch inflammatorische Stimuli induziert bzw. hochreguliert wird (Engblom et al. 2003; Matsumura und Kobayashi 2004; Steiner et al. 2006; Yamagata et al. 2001). Man beobachtet nach systemischer Behandlung mit LPS eine starke Induktion von COX-2 und

mPGES-1 in peripheren Organen und besonders auch im Gehirn (Damm et al. 2012; Harden et al. 2014; Ivanov et al. 2002; Vasilache et al. 2015). Die Position von mPGES-1 am letzten Schritt des PGE₂-Synthesewegs und die Tatsache, dass dieses Enzym am stärksten und dauerhaftesten unter inflammatorischen Bedingungen hochreguliert wird, machen es zu einem attraktiven Ziel für pharmakologische Interventionen (Ivanov und Romanovsky 2004).

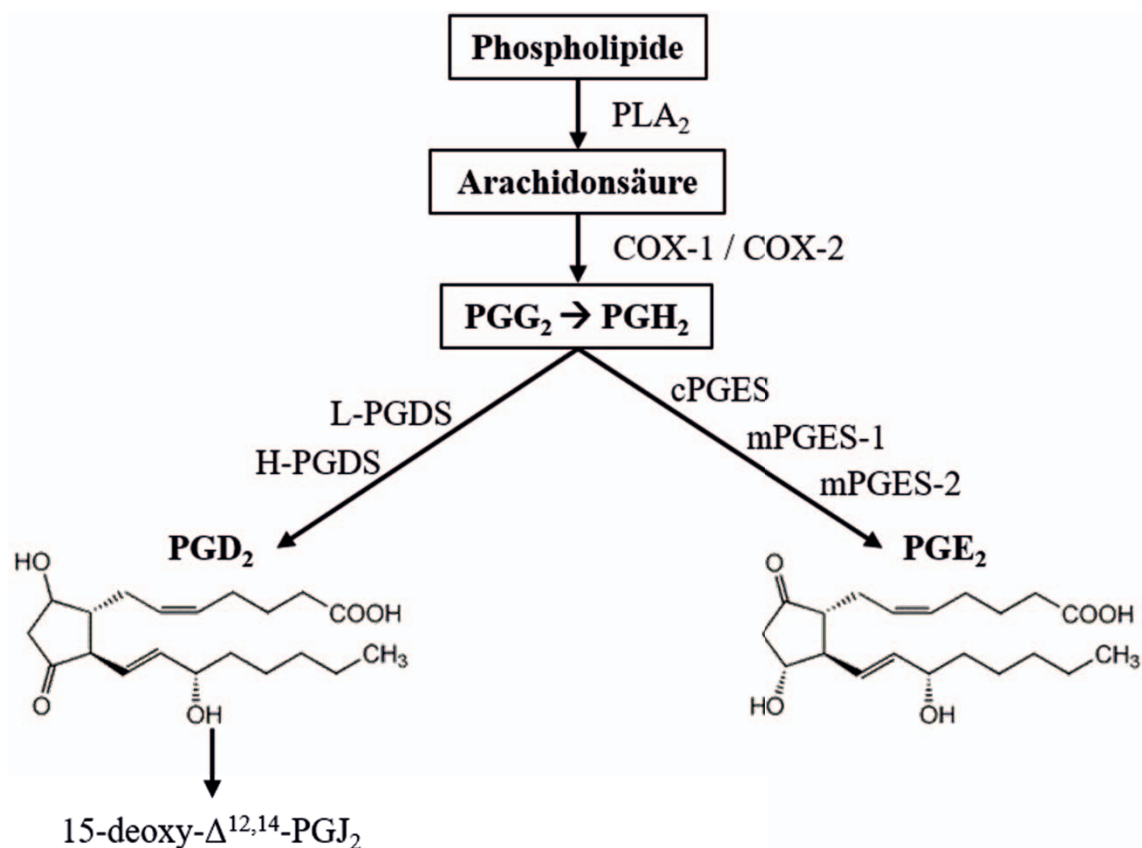


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Wege, die zur Bildung von PGE₂ und PGD₂ führen

Abkürzungen: PLA₂ = Phospholipase A₂; COX = Zyklooxygenase; PG = Prostaglandin; PGS = Prostaglandin-Synthase; c = zytosolisch; m = mikrosomal; L = Lipocalin-Typ; H = hämatopoetischer Typ.

1.2. Besonderheiten der PGE₂-Synthese im Gehirn

PLA₂ wurde bis vor wenigen Jahren als einziges Enzym angesehen, dass die zur PG-Synthese notwendige Arachidonsäure bereitstellt. Jedoch konnte in einer experimentellen Studie gezeigt werden, dass PLA₂-defiziente Mäuse im Gehirn über unbeeinträchtigte

Konzentrationen an Arachidonsäure verfügen (Rosenberger et al. 2003). Im Gegensatz dazu war bei Mäusen, bei denen das Enzym Monoacylglycerol-Lipase genetisch ausgeschaltet wurde, der Gehalt an Arachidonsäure im ZNS stark reduziert (Nomura et al. 2011). Arachidonsäure wird im Gehirn über einen alternativen Weg aus 2-Arachidonolylglycerol, einem Endocannabinoid, gebildet, wobei das Enzym Monoacylglycerol-Synthase eine entscheidende Rolle spielt. So konnte in zwei voneinander unabhängigen und fast zeitgleich vor kurzem publizierten Studien gezeigt werden, dass Mäuse, bei denen dieses Enzym genetisch ausgeschaltet oder pharmakologisch antagonisiert wurde, nicht mehr über die zu einer vollständig ausgeprägten Fieberentstehung notwendige PGE₂-Bildung im Hypothalamus verfügen (Kita et al. 2015; Sanchez-Alavez et al. 2015). Inhibitoren der Monoacylglycerol-Lipase wird von den Autoren dieser Studien somit ein beträchtliches therapeutisches Potenzial zur Behandlung bestimmter neuroinflammatorischer Prozesse prognostiziert.

1.3. Physiologische Aufgaben von PGE₂ und PGD₂

Biologische Wirkungen von Eicosanoiden im tierischen Organismus sind überaus vielfältig. Sie reichen von Effekten auf glatte Muskelzellen, Epithelien, Gefäßendothel oder Drüsenzellen bis hin zur Beeinflussung von Thrombozyten, Osteoklasten oder Neuronen. Hier soll lediglich kurz auf die wichtigsten Aufgaben der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Prostaglandine PGE₂ und PGD₂ eingegangen werden.

Für PGE₂ wurden verschiedene Einflüsse auf die Nierenfunktion beschrieben, wie z.B. Modulation von Nierendurchblutung und glomerulärer Filtrationsrate, Steuerung der Reninfreisetzung und Auswirkungen auf die Wasser- und Elektrolytresorption (Breyer und Breyer 2000). Im Verdauungstrakt ist PGE₂ maßgeblich an der protektiven Schleim- und Hydrogencarbonatproduktion sowie einer Steigerung der Durchblutung des Magen-Darm-Trakts beteiligt (Wallace 2008). Im Rahmen der Schmerzentstehung wird PGE₂ eine wichtige Rolle bei der Sensibilisierung von Noziceptoren, aber auch bei deren direkter Aktivierung zugeschrieben (Kidd und Urban 2001). Diese Effekte manifestieren sich besonders bei Entzündungsprozessen, an deren Entstehung und Regulierung PGE₂ ebenfalls maßgeblich mitwirkt. Im Gehirn ist PGE₂ an der Entstehung einiger unspezifischer Krankheitssymptome beteiligt (Pecchi et al. 2009; Saper et al. 2012), Auf

die zentrale Rolle von PGE₂ bei der Fieberentstehung wird in einem der folgenden Abschnitte gesondert eingegangen (siehe Abschnitt 1.5).

Im Gegensatz zu PGE₂ wurde PGD₂ lange Zeit als weniger bedeutsam, gelegentlich sogar als biologisch inaktiv eingestuft. Später wurde jedoch festgestellt, dass PGD₂ in der Peripherie von Mastzellen und basophilen Granulozyten in beträchtlichen Mengen synthetisiert wird; im Gehirn wurde PGD₂ unter Normalbedingungen sogar als das am stärksten präsente PG identifiziert (Joo und Sadikot 2012). In Einklang mit seinem zellulären Ursprung spielt PGD₂ in der Peripherie daher eine Rolle bei allergischen Reaktionen und Erkrankungen, z.B. Asthma bronchiale. Jedoch wurden für PGD₂ auch etliche anti-inflammatorische Effekte dokumentiert (Ajuebor et al. 2000; Joo und Sadikot 2012). Die wichtigsten Funktionen von PGD₂ im Gehirn betreffen die Regulation des Schlaf-Wach-Zyklus, die Freisetzung bestimmter Hormone, Modulation von Geruchs- und Schmerzempfindungen und Einflüsse auf die Thermoregulation (Joo und Sadikot 2012; Krall et al. 2010; Saper et al. 2012; Urade und Hayaishi 2011). Antipyretische und anti-inflammatorische Effekte von PGD₂ in und außerhalb des Gehirns scheinen zum Teil über seinen nicht-enzymatisch generierten Metaboliten 15-d-PGJ₂ (Abbildung 2) vermittelt zu sein (McAdam et al. 2000; Mouihate et al. 2004; Ricote et al. 1998). 15-d-PGJ₂ hat die Fähigkeit, PPARs (Peroxisom-Proliferator-aktivierende Rezeptoren) zu aktivieren und eine Reihe an pro-inflammatorischen Signalwegen, wie z.B. den *Nuclear Factor kappa B* (NF-κB)-Signalweg, zu hemmen (Harris und Phipps 2002; Joo und Sadikot 2012; Sandig et al. 2007; Straus et al. 2000).

1.4. Rezeptoren für PGE₂ und PGD₂

Rezeptoren für PGE₂ sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren mit 7 Transmembrandomänen. Man unterscheidet 4 Subtypen mit den Bezeichnungen EP1, EP2, EP3 und EP4. Von EP3, der für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Fragestellungen besonders relevant erscheint, gibt es mehrere Subtypen / Spleißvarianten, deren wichtigste EP3α, EP3β und EP3γ genannt werden (Hatae 2003; Kotani et al. 1995; Ushikubi et al. 1995). Im Rahmen der Signaltransduktion nach der jeweiligen Rezeptoraktivierung durch PGE₂, sind als Haupteffekte für EP1 ein Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration, für EP2 und EP4 ein Anstieg der intrazellulären

cAMP-Konzentration und für EP3 ein Abfall der intrazellulären cAMP-Konzentration zu verzeichnen (Oka 2004) (Tabelle 1).

Subtyp	Isoform	Second messenger
EP1		[Ca ²⁺] Anstieg
EP2		cAMP Anstieg
EP3	EP3 α	cAMP Abfall
	EP3 β	cAMP Abfall
	EP3 γ	cAMP Abfall, Anstieg
EP4		cAMP Anstieg

Tabelle 1: Subtypen der PGE₂-Rezeptoren und die hauptsächlichen second messenger, die nach Rezeptoraktivierung intrazelluläre Reaktionen vermitteln (verändert nach Oka 2004)

Es muss ergänzend erwähnt werden, dass die verschiedenen Spleißvarianten des EP3-Rezeptors nach Stimulation mit PGE₂ Dosis-abhängig zusätzlich zu einem Anstieg der intrazellulären Konzentration an Inositol-Triphosphat (IP3) und Ca²⁺ führen (Schmid et al. 1995; Sugimoto und Narumiya 2007). Die Untereinheit G $\beta\gamma$ des EP3-gekoppelten inhibitorischen G-Proteins (Absinken des cAMP-Spiegels, Tabelle 1) bewirkt eine Ca²⁺-Mobilisierung, sodass es nach EP3-Aktivierung auch zu einem Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration kommt (Hatae et al. 2002).

Mittels *in situ*-Hybridisierung wurde im Gehirn der Ratte die Verteilung der Rezeptoren für PGE₂ untersucht (Oka et al. 2000; Vasilache et al. 2007). Für die im Rahmen dieser Studie untersuchten Hirnstrukturen (OVLT, MnPO und umgebende präoptische Region) zeigten sich hierbei markante Unterschiede. So ist im OVLT der EP3-Rezeptor kaum exprimiert; hier lassen sich dagegen EP1 und EP4 markant nachweisen. Im MnPO dagegen zeigte sich eine ausgeprägte Expression von EP3 und EP4. Diese unterschiedlichen Verteilungen der PGE₂-Rezeptoren in den für die Fieberentstehung relevanten Gehirnstrukturen haben beträchtliche funktionelle Konsequenzen (siehe Abschnitt 1.5). Mit Hilfe von Mäusen, bei denen jeweils einzelne PGE₂-Rezeptoren genetisch ausgeschaltet wurden, konnte nämlich gezeigt werden, dass der EP3-Rezeptor für die Ausbildung von Fieber kritisch ist, EP1 jedoch bei der Initiierung einer Fieberreaktion beteiligt ist (Oka et al. 2003b; Ushikubi et al. 1998).

Wie bereits erwähnt, sind beschriebene anti-inflammatorische Effekte von PGD_2 über dessen Metaboliten 15-d-PGJ_2 erklärt worden, der durch Interaktion mit $\text{PPAR-}\gamma$ die Bildung von Entzündungsmediatoren, unter anderem auch von PGE_2 , über eine Hemmung des wichtigsten pro-inflammatorischen Transkriptionsfaktors ($\text{NF-}\kappa\text{B}$) unterdrückt (Straus et al. 2000). Im Rahmen dieser Arbeit wurden jedoch auch direkte zelluläre Antworten auf Stimulation mit PGD_2 untersucht und dokumentiert (siehe Abschnitt C), denen eine Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Membranrezeptoren zugrunde liegen muss. Für PGD_2 unterscheidet man hierbei den DP1 und den DP2 Rezeptor. Während die Aktivierung von DP1 zu einem Anstieg an cAMP führt, wurde nach DP2 Aktivierung ein Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration durch Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellularraum beschrieben (Bos et al. 2004; Hirai et al. 2001). Im Gehirn ist das kritische Enzym zur Bildung von PGD_2 (PGD-Synthase vom Lipocalin-Typ) mit dem DP1-Rezeptor kolokalisiert, vor allem in den Hirnhäuten und im *Plexus choroideus* (Mizoguchi et al. 2001). Hier scheint PGD_2 über den DP1-Rezeptor den bekanntesten zentralnervösen Effekt dieses Prostanoids, die Förderung des Schlafs, zu vermitteln (Saper et al. 2012; Urade und Hayaishi 2011).

1.5. Die zentrale Bedeutung von PGE_2 für die Fieberentstehung

In der Tat scheint PGE_2 in vielen, wenn auch nicht allen, experimentellen Fiebermodellen und häufig auch unter klinischen Bedingungen eine essentielle Rolle zu spielen (Harden et al. 2015; Roth und Blatteis 2014). Die aus zahlreichen experimentellen Studien abgeleiteten Argumente, die für eine obligatorische Rolle von PGE_2 bei der Fieberentstehung sprechen, können wie folgt zusammengefasst werden. Selbst in geringer Dosierung induzieren Mikroinjektionen von PGE_2 in das zerebrale Ventrikelsystem reproduzierbare Fieberreaktionen (Milton 1998; Milton und Wendlandt 1971). Mikroinjektionen von PGE_2 direkt in das Hirnparenchym induzieren jedoch nur dann Fieber, wenn die Gabe in ein eng umschriebenes Gehirnnareal erfolgt, das wegen eben dieser Eigenschaft auch als „pyrogene Zone“ bezeichnet wird. Diese Zone umfasst das OVLT und die in unmittelbarer Umgebung lokalisierten Regionen der präoptischen Region, speziell der MnPO (Lazarus 2006; Matsumura et al. 1990; Oka 2004; Scammell et al. 1996; Williams et al. 1977). Nach peripherer Injektion einer fiebererzeugenden

Substanz (z.B. LPS) steigen zeitgleich mit dem Einsetzen der Fieberreaktion die Konzentrationen an PGE₂ im Blut, in der zerebrospinalen Flüssigkeit des 3. Hirnventrikels und in den aus der präoptischen Region gewonnenen Mikrodialyseproben an und spiegeln sogar den Fieberverlauf wieder (Coceani et al. 1988; Rotondo et al. 1988; Sehic et al. 1996). 1971 wurde erstmals nachgewiesen (Vane 1971), dass Aspirin und entsprechend wirkende weitere Pharmaka die Synthese von PGE₂ blockieren. Dieser Effekt beruht auf der Hemmung der COX-Enzyme. Untersuchungen an zahlreichen Spezies zeigten, dass man die Ausbildung einer Pyrogen-induzierten Fieberreaktion durch COX-Inhibitoren wirksam unterdrücken oder zumindest abschwächen kann (Botting 2004; Milton 1998; Roth et al. 2002; Roth 2006; Rummel et al. 2005). Da man nach Stimulation mit einem exogenen Pyrogen oder aber mit bestimmten Zytokinen (endogene Pyrogene) eine Induktion von COX-2 und mPGES-1, den induzierbaren Enzymen der PG-Synthese, in der Peripherie und besonders im Gehirn nachweisen kann (Engblom et al. 2003; Matsumura und Kobayashi 2004; Steiner et al. 2006; Yamagata et al. 2001), wurde postuliert, dass diese induzierbaren, nicht aber die konstitutiv exprimierten Isoformen dieser Enzyme das zur Fieberentstehung notwendige PGE₂ bilden. Experimentelle Unterstützung für diese Hypothese lieferte die Untersuchung von COX-1 *versus* COX-2 defizienten *knockout* Mäusen; die Entstehung von LPS-induziertem Fieber war lediglich bei den COX-2 knockout-Mäusen unterdrückt (Li et al. 1999; Steiner et al. 2005). Entsprechend konnten auch Mäuse, denen das Enzym PGES-1 fehlt, keine adäquate Fieberantwort entwickeln (Engblom et al. 2003).

Dass PGE₂ nach inflammatorischer Stimulation fast zeitgleich peripher (im Blut) und zentral (Hirnventrikel, präoptische Region) ansteigt hat zu kontroversen Diskussionen geführt, ob nun eher das peripher oder das zentral gebildete PGE₂ den entscheidenden Beitrag zur Fieberentstehung liefert (Roth und Blatteis 2014; zur Übersicht). Gegenwärtig nimmt man aufgrund der Zeitverläufe experimentell erzeugter mehrphasiger Fieberreaktion und der parallel dazu induzierten Bildung von COX-2 / mPGES-1 in der Peripherie bzw. im Gehirn an, dass die frühe Fieberphase durch peripher produziertes PGE₂ entsteht, während im Gehirn bzw. in Zellen der Blut-Hirn-Schranke gebildetes PGE₂ für die längeren, späteren Fieberphasen zuständig ist (Engström et al. 2012; Romanovsky et al. 2006; Roth und Blatteis 2014; Steiner et al. 2006; Wilhelms et al. 2014). Wie peripher gebildetes PGE₂ Signale zur Fieberentstehung in das Gehirn transferiert und wie zentral gebildetes PGE₂ in den relevanten Hirnstrukturen Reaktionen

auslöst, die im Einklang mit einer fieberhaften Erhöhung der Körpertemperatur stehen, sind die zentralen Fragestellungen dieser Arbeit.

Vergleichsweise wenig experimentelle Studien gibt es bezüglich einer Bedeutung von PGD_2 bei der Entstehung des Fiebers. Diesem Prostanoid oder aber seinem Metaboliten 15-d-PGJ_2 werden bis dato hauptsächlich antipyretische Wirkungen zugesprochen (Krall et al. 2010; Mouihate et al. 2004).

2. Funktionelle Neuroanatomie des Thermoregulationssystems

Basierend auf experimentellen Studien mit unterschiedlichsten methodischen Ansätzen wurden bereits seit vielen Jahrzehnten Modelle zur Funktionsweise des Thermoregulationssystems der Säuger entwickelt und publiziert (Bligh 1979; Bligh 2006; Brück und Zeisberger 1987; Hammel 1968; Simon 1981; Simon et al. 1986). Hierbei war man ursprünglich von einem im Hypothalamus lokalisierten Regelzentrum ausgegangen, das einen „Sollwert“ mit der aktuellen Körpertemperatur vergleicht und jede Abweichung von dieser Referenztemperatur als Störsignal interpretiert und hierdurch adäquate thermoregulatorische Reaktionen mit dem Ziel induziert, das Störsignal zu beseitigen (Hammel et al. 1963). Diese an einen technischen Regelkreis erinnernde Sichtweise mit einem „Thermostaten“ als Regler hat jedoch jegliche Unterstützung verloren, da man ein neuronales Signal, das einem „Sollwert“ im technischen Regelkreis entsprechen würde, niemals nachweisen konnte (Brück und Zeisberger 1987; Roth und Blatteis 2014). Nicht umstritten und neuroanatomisch klar umschrieben sind jedoch die wesentlichen Komponenten, die das biologische Thermoregulationssystem charakterisieren. Hierzu gehören periphere und zentrale Thermosensoren, ein neuronales thermoafferentes System, bestimmte Neuronenverbände in der präoptischen / hypothalamischen Region und efferente neuronale Verbindungen zu so genannten Effektororganen (Blutgefäße, Schweißdrüsen, Atmungstrakt, Skelettmuskulatur, braunes Fettgewebe), mit deren Hilfe Wärmebildung und Wärmeabgabe an veränderte Bedingungen angepasst werden können. Die hypothalamischen Neuronenverbände erhalten hierbei Signale der fast ausschließlich peripher lokalisierten Kaltsensoren und der vorwiegend zentral lokalisierten

Warmsensoren. Dominieren Signale der Warmsensoren, werden Wärmeabgabemechanismen aktiviert und über Interneurone die efferenten Bahnen gehemmt, welche zur gesteigerten Wärmebildung führen würden. Bei Dominanz von Signalen der Kältesensoren wäre dies genau umgekehrt.

Im Verlauf der letzten 10 Jahre hat sich die Sichtweise über die funktionelle Organisation des Thermoregulationssystems weiter verändert (McAllen et al. 2010; Nakamura 2011; Romanovsky 2007). Nach wie vor ist allgemeiner Konsens, dass es sensorisch afferente Anteile, zentrale integrative Strukturen und efferente Anteile zur Steuerung peripherer Effektororgane gibt. Die regulierenden Strukturen der präoptischen Region (siehe Abschnitt 2.3) erhalten afferente Informationen über periphere und zentrale Veränderungen der Körpertemperatur, über Signale des aktivierten Immunsystems und über andere homöostatische Parameter (z.B. über die Osmolarität der Körperflüssigkeiten). Dort werden diese Signale integriert, und ausgehend von der präoptischen Region werden efferente neuronale Signale zu den Effektororganen geschickt. Dieses System besteht aus mehreren voneinander unabhängig aktivierbaren Sensor – Effektor Schleifen, die jeweils über ihre eigenen Afferenzen und Efferenzen verfügen. Solche Schleifen arbeiten jedoch koordiniert an dem gemeinsamen Ziel, die Temperaturhomöostase aufrechtzuerhalten oder neuen Gegebenheiten anzupassen, ohne dass hierzu ein „Sollwert“ notwendig ist (Nakamura 2011; Romanovsky 2007) (siehe Abbildung 3). Diese thermoregulatorischen Kontrollschleifen benötigen keine zentralen Integrationsstrukturen mit wechselseitigen „über-Kreuz-Verschaltungen“ zwischen hypothalamischen Wärmebildungs- und Wärmeabgabezentren, wie es in früheren Modellen postuliert wurde (Bligh 1979; Bligh 2006; Brück und Zeisberger 1987). Vielmehr verfügt jeder Thermoeffektor über eine individuelle Schleife, die jeweils durch eigene aktivierende Schwellentemperaturen charakterisiert ist (McAllen et al. 2010).

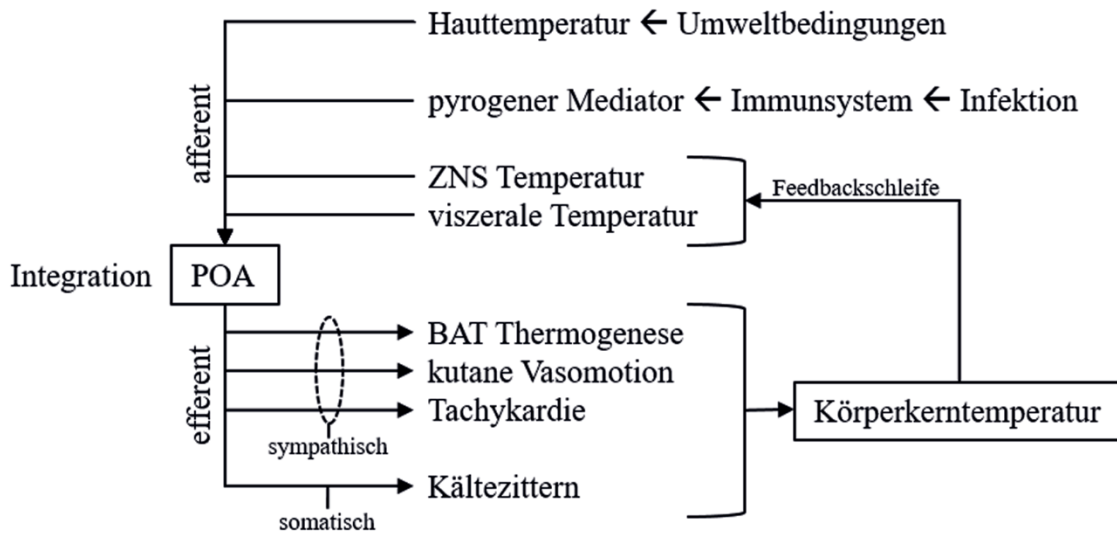


Abbildung 3: Schematische Organisation des Thermoregulationssystems der Säuger
 Jeder einzelne Thermoeffektor wird durch eine individuelle Kontrollschleife gesteuert,
 nähere Erläuterungen: siehe Text (verändert nach Nakamura 2011)
 POA: präoptische Region / anteriorer Hypothalamus; BAT: braunes Fettgewebe

Da sich im Laufe der letzten 10-15 Jahre auch detaillierte neuroanatomische und physiologische Erkenntnisse zu einzelnen Komponenten des Thermoregulationssystems ergeben haben, sollen diese im Folgenden kurz vorgestellt werden.

2.1. Periphere Thermosensoren

Jede der in Abbildung 3 gezeigten thermoregulatorischen Kontrollschleifen beginnt mit Sensoren, bei denen es sich auch durchaus um Sensoren, die auch nicht-thermische Signale wie z.B. inflammatorische Moleküle detektieren können, handeln kann. Die wichtigsten Signale, die vom Thermoregulationssystem wahrgenommen werden, sind jedoch Veränderungen der zentralen oder peripheren Temperaturen im Körperkern bzw. in der Körperschale. In der Körperschale (Haut, Mukosa der Mundhöhle oder des Urogenitaltrakts) dominieren von der Anzahl her eindeutig die Kältesensoren. Bei diesen handelt es sich um freie Nervenendigungen kleinerer, schwach myelinisierter ($A\delta$ -Fasern) spinaler Neurone bzw. mit Hirnnerven verlaufender Neurone. Die selteneren peripheren Wärmesensoren verfügen über unmyelinisierte Axone (C-Fasern). Periphere Thermosensoren verfügen über eine statische und eine dynamische Komponente, d.h. sie reagieren auf absolute Temperaturen und auf Temperaturveränderungen (Braun et al.

1980; Romanovsky 2007; Schäfer et al. 1982 zur Übersicht). Als zelluläre Mechanismen der intrinsischen Thermosensitivität dieser Neurone wurden Veränderungen des Ruhemembranpotenzials durch modifizierte K^+ -Leitfähigkeiten oder Hemmungen der Na^+ / K^+ -ATPase vorgeschlagen (Peier et al. 2002; Pierau et al. 1974; Reid und Flonta 2001; Reid und Flonta 2002; Schäfer und Braun 1990). Bereits bei der ersten publizierten Charakterisierung von den in der Haut lokalisierten kältesensitiven Fasern wurde festgestellt, dass diese auch durch Menthol, einem Inhaltsstoff der Minze, aktiviert werden können (Hensel und Zottermann 1951). Dieser Befund wurde in späteren Studien mit Hilfe unterschiedlicher methodischer Ansätze bestätigt (Okazawa et al. 2000; Reid und Flonta 2002; Schäfer et al. 1986). Diese Eigenschaft ermöglicht gezielte Untersuchungen von Kältesensoren bei isoliert kultivierten Neuronen aus Spinalganglien.

Einen großen Fortschritt bei der experimentellen Erforschung peripherer Thermo- aber auch Schmerzsensoren erbrachte die Entdeckung der so bezeichneten TRP-Kanäle. Es handelt sich hierbei um nicht-selektive Kationenkanäle. Einige dieser Kanäle repräsentieren das molekulare Korrelat der Kalt- und Warmsensoren. So wird der Kanal TRPM8 geöffnet, wenn die lokale Temperatur unter 25°C absinkt (Caterina 2007; Romanovsky 2007); exakt unter diesen Bedingungen beobachtet man bei kältesensitiven Nervenfasern eine Erhöhung der Impulsfrequenz (Braun et al. 1980). Analog öffnet sich der Kanal TRPV4, wenn die lokale Temperatur über 32°C ansteigt, was den Eigenschaften warmsensitiver Nervenfasern der Haut entspricht (Caterina 2007). TRPV4 wird nicht nur in der Körperschale (Warmfasern, Keratinozyten), sondern auch in der präoptischen Region exprimiert, wo die relevanteste Stelle der zentralen Warmsensitivität (Amano et al. 2003) lokalisiert ist (Caterina 2007; Güler et al. 2002).

Im Einklang mit den postulierten Funktionen von TRPM8 und TRPV4 als molekulare Basis kalt- bzw. warmsensitiver Neurone stehen Befunde die mit Mäusen erzielt wurden, bei denen TRPM8 bzw. TRPV4 genetisch oder pharmakologisch ausgeschaltet wurden. Bei Mäusen mit TRPM8-Defizienz beobachtet man eingeschränkte autonome und Verhaltensreaktionen gegenüber Kälteexpositionen (Almeida et al. 2012; Dhaka et al. 2007). Entsprechende Ausschaltung bzw. Antagonisierung von TRPV4 führt dagegen zu einer Einschränkung der Reaktionen auf Wärmebelastung (Caterina 2007; Vizin et al. 2015). *In vitro* können TRP-Kanäle mittels elektrophysiologischer Methoden oder aber mittels intrazellulärer Ca^{2+} -Messungen funktionell untersucht werden (Okazawa et al. 2000; Reid et al. 2002).

2.2. Das zentrale thermoafferente System

Die Axone der peripheren thermosensitiven Nervenendigungen, deren Zellkörper in den Spinalganglien lokalisiert sind, verlaufen in den Spinalnerven (im Kopfbereich auch in Hirnnerven) und ziehen in die Dorsalhörner des Rückenmarks, wo ihre Information auf das zweite Neuron im thermoafferenten System übertragen wird (Morrison und Nakamura 2011). Die meisten dieser Neurone liegen in der äußeren Schicht der Dorsalhörner des Rückenmarks (Lamina 1) (Craig und Andrew 2002; Craig und Blomqvist 2002). Die Axone dieser zweiten Neurone des nunmehr zentralen Anteils des thermoafferenten Systems transferieren die thermische Information zu zwei kritischen Gehirnregionen, dem Thalamus und dem in der Pons gelegenen lateralen parabrachialen Nukleus (LPB). Die Neurone, die direkten synaptischen Kontakt zum Thalamus aufnehmen, bilden den spinothalamischen Trakt. Die im Thalamus gelegenen dritten Neurone des thermoafferenten Systems projizieren zum primären somatosensorischen Cortex, wo Perzeption und Diskriminierung der thermischen Information erfolgen (Craig und Andrew 2002; Morrison und Nakamura 2011).

Das zweite wichtige Projektionsgebiet der in der Lamina 1 der Dorsalhörner gelegenen Neurone ist der LPB (siehe auch Abbildung 4). Der neuronale Aktivitätsmarker FOS konnte nach äußerer Kälteexposition in diesem Kerngebiet in starkem Umfang nachgewiesen werden (Bratincsák und Palkovits 2004). Elegante „neuronal tracing Experimente“ zeigten, dass die durch Kälte oder auch Wärme aktivierten LPB-Neurone diese Information direkt monosynaptisch in den MnPO der präoptischen Region weiterleiten. Periphere Kälte- und Wärmesignale werden hierbei durch zwei verschiedene Populationen im LPB verarbeitet und zum MnPO transportiert. Hiermit war das neuronale Korrelat für die zentrale Bedeutung der präoptischen Region für die Thermoregulation der Säuger nachgewiesen (Nakamura und Morrison 2008a).

2.3. Thermosensitive und thermointegrative Strukturen im Bereich des anterioren Hypothalamus

Die im MnPO einlaufende thermische Information muss nun so verarbeitet werden, dass je nach Stimulus adäquate thermoregulatorische Effektorreaktionen eingeleitet werden. Auch diese Prozesse wurden von Nakamura und Morrison intensiv untersucht (Morrison und Nakamura 2011; Nakamura 2011; zur Übersicht). So konnte gezeigt werden, dass die thermisch stimulierten LPB-Neurone, welche den MnPO direkt kontaktieren, als Transmitter Glutamat verwenden (Nakamura und Morrison 2008b). Diese durch periphere Kältereize aktivierten MnPO-Neurone verwenden den inhibitorischen Transmitter GABA und projizieren zu dem in unmittelbarer Nachbarschaft gelegenen medianen präoptischen Areal (MPA; siehe Abbildung 4). Eine zweite durch periphere Wärmereize aktivierte Population an MnPO-Neuronen verwendet dagegen den erregenden Transmitter Glutamat (Morrison und Nakamura 2011), eine zelluläre Erklärung für die antagonistische Wirkung dieser beiden Neuronenpopulationen. Auch die auf diese Weise gehemmten (durch Kälte) oder aktivierten (durch Wärme) MPA-Neurone verwenden GABA als Überträgerstoff an den nachgeschalteten Neuronen. Diese GABAergen MPA-Neurone sind als Ausgangspunkte der efferenten neuronalen Bahnen anzusehen, die letztendlich an den Thermoeffektororganen enden (Morrison und Nakamura 2011; Nakamura 2011). Im Folgenden soll hier spezifisch auf die neuronale thermoregulatorische Beeinflussung des braunen Fettgewebes (BAT; zitterfreie Wärmebildung), der Skelettmuskulatur (Kältezittern) und der peripheren Blutgefäße (Vasokonstriktion) eingegangen werden.

2.4. Efferente Bahnen vom Hypothalamus zu den Effektororganen

An der Charakterisierung der efferenten Nervenbahnen, die zur Aktivierung der drei erwähnten Effektororgane führen, haben neben Nakamura und Morrison auch andere Arbeitsgruppen wesentliche Beiträge geleistet (McAllen et al. 2010; Nagashima et al. 2000; Tanaka et al. 2002; Tanaka et al. 2006). Diese Bahnen, inklusive ihrer Aktivitätszustände unter thermoneutralen Bedingungen (warme Umgebung) oder aber unter Kältebelastung und bei Fieber, sind in Abbildung 4 zusammengestellt. Die

Abbildung zeigt auch die in Abschnitt 2.3 vorgestellten zentralen Thermoregulationsstrukturen der präoptischen Region und deutet auch das in Abschnitt 2.2 behandelte thermoafferente System an.

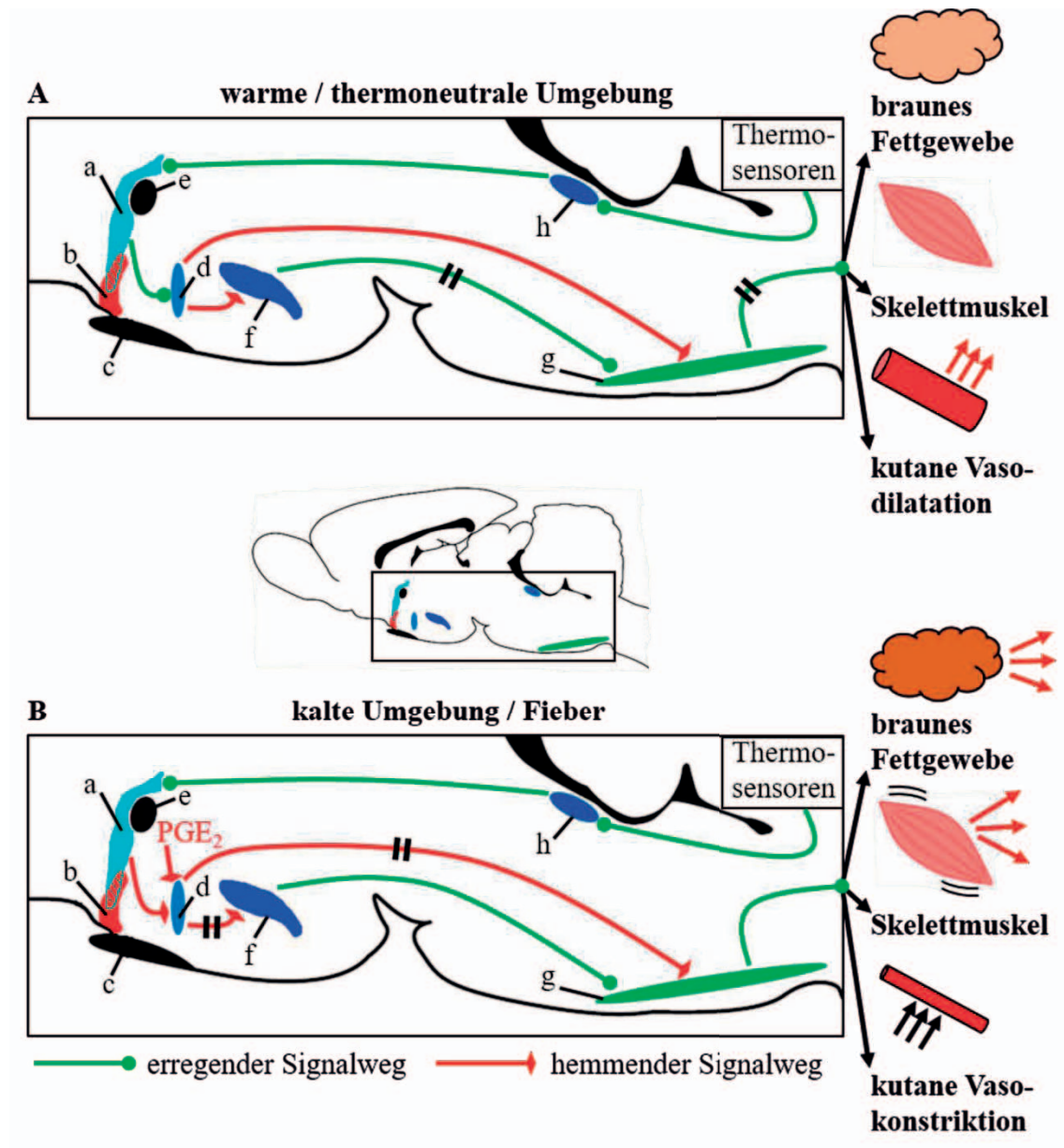


Abbildung 4: Schematische Darstellung der zentralen thermoregulatorischen Signalwege und der topographischen Lage der betroffenen Kerngebiete

Die Abbildung zeigt die thermoregulatorischen Signalwege in einer warmen Umgebung (A) und in einer kalten Umgebung bzw. im Falle eines Fiebers (B).

(a) MnPO = Nucleus medianus praeopticus; (b) OVLT = Organum vasculosum laminae terminalis; (c) Chiasma opticum; (d) MPA = medianes präoptisches Areal; (e) Commissura anterior; (f) DMH = dorsomedialer Hypothalamus; (g) RPa = Nucleus raphe pallidus; (h) LPB = lateraler parabrachialer Nukleus

Die bereits erwähnten GABAergen Neurone des MPA kontrollieren zwei verschiedene efferente neuronale Bahnen, welche die thermoregulatorischen Effektororgane in ihrer Aktivität steuern. Eine Bahn dient der Kontrolle des peripheren Gefäßtonus. So wird zum Beispiel von der Ratte die Schwanzdurchblutung sehr massiv zur Thermoregulation eingesetzt. Der erste Teil der Nervenbahn, welche die periphere Durchblutung den thermischen Gegebenheiten anpasst, führt über ein vergleichsweise langes Axon von den MPA-Neuronen zum im ventralen Hirnstamm gelegenen rostralen Anteil des *Nucleus raphe pallidus* (RPa; Morrison und Nakamura 2011; Tanaka et al. 2002). Dort werden glutamaterge, stimulierende Neurone kontaktiert, deren Axone direkt zu denjenigen im Rückenmark gelegenen präganglionären sympathischen Neuronen ziehen, welche für den peripheren Vasokonstriktortonus zuständig sind. Diese wiederum senden ihre Axone zu postganglionären sympathischen Neuronen, die dann direkt periphere thermoregulatorisch relevante Blutgefäße, zum Beispiel in der Haut, in den Ohren des Kaninchens oder aber im Schwanz der Ratte, ansteuern (Nakamura et al. 2004; Ootsuka et al. 2004; Ootsuka und McAllen 2005). Zwei weitere Thermoeffektororgane, das braune Fettgewebe (zitterfreie Wärmebildung) und Skelettmuskulatur (Kältezittern), werden über zunächst parallel verlaufende efferente Nervenbahnen angesteuert (Morrison und Nakamura 2011). Für beide Efferenzen erfolgt die synaptische Umschaltung der GABAergen Neurone der MPA zunächst auf glutamaterge Neurone, die im dorsomedialen Hypothalamus (DMH) lokalisiert sind (Nakamura et al. 2005). Diese Neurone schicken nun ihre Axone ebenfalls zum rostralen RPa, wo zwei Populationen kontaktierter Neurone durch Glutamat aktiviert werden. Die eine Population stimuliert wiederum durch Glutamat diejenigen präganglionären sympathischen Neurone, welche über postganglionäre sympathische Neurone direkt das braune Fettgewebe mittels Noradrenalin zur Wärmebildung anregen. Die zweite Population der RPa Neurone sendet Axone direkt zu α - und γ - Motoneuronen in den Ventralhörnern des Rückenmarks, deren Aktivierung durch Glutamat zum Kältezittern führt (Nakamura und Morrison 2011).

2.5. Die Aktivität des Thermoregulationssystem unter thermoneutralen Bedingungen

Unter Berücksichtigung der neuroanatomischen Organisation des Thermoregulationssystems der Säuger, kann man sich dessen Funktionszustand unter Thermoneutralbedingungen folgendermaßen vorstellen. Es werden keine Signale von peripheren Kältesensoren über das dorsale Rückenmark und den lateralen parabrachialen Nukleus zum MnPO geleitet. Vom MnPO aus werden demzufolge keine GABAergen (hemmenden) Signale zur benachbarten MPA gesendet. Die dort lokalisierten ebenfalls GABAergen Neurone üben somit einen unbeeinträchtigten hemmenden Einfluss auf die glutaminergen (aktivierenden) Neurone im RPa und im DMH aus. Die efferenten Signalwege zur Aktivierung peripherer Vasokonstriktion, zitterfreier Wärmebildung und Kältezittern verbleiben somit im gehemmten Zustand. Es findet keine zusätzliche thermoregulatorische Wärmebildung bzw. auch keine aktive Reduzierung der Wärmeabgabe statt (Abbildung 4 A).

2.6. Die Aktivität des Thermoregulationssystem unter Kältebelastung

Bei äußerer Kältebelastung verändert sich der Funktionszustand des Thermoregulationssystems folgendermaßen. Es erfolgt eine Aktivierung peripherer Kältesensoren über die Öffnung von TRPM8-Kanälen. Es entsteht ein Generatorpotential, das je nach Stärke der Kältebelastung (statisch und dynamisch) in entsprechende Frequenzen von Aktionspotentialen kodiert wird. Diese Information wird über das dorsale Rückenmark und den lateralen parabrachialen Nukleus zum MnPO geleitet, wo es an den Zielneuronen zur vermehrten Ausschüttung von Glutamat kommt. Die so aktivierten MnPO-Neurone geben ihren hemmenden Transmitter GABA nun an die nachgeschalteten ebenfalls GABAergen Neurone in der benachbarten MPA ab. Diese Neurone, die ansonsten einen tonisch inhibitorischen Einfluss auf die efferenten Bahnen zu den Thermoeffektororganen ausüben, werden nun selbst gehemmt und die von der MPA ausgehende Hemmung des RPa und des DMH entfällt. Dies führt dazu, dass der erregende Transmitter Glutamat der RPa- und DMH-Neurone vermehrt ausgeschüttet wird. Hierdurch werden zum einen die Zwei-Neuronen-Ketten der sympathischen Verbindungen zu peripheren Blutgefäßen und

zum braunen Fettgewebe aktiviert. Zum anderen erhalten auch die in den Ventralhörnern lokalisierten Motoneurone einen erregenden Input. Am Ende sind periphere Vasokonstriktion, zitterfreie Wärmebildung und Kältezittern zu beobachten (Abbildung 4 B).

2.7. Mögliche Angriffspunkte für PGE₂

Wenn sich eine Fieberreaktion manifestiert, sind in der frühen Phase des Temperaturanstiegs dieselben Thermoeffektorreaktionen zu beobachten wie unter Kältebelastung (Roth und Blatteis 2014). Wenn man postuliert, dass PGE₂ hierbei eine entscheidende Rolle spielt, stellt sich die Frage, an welcher Stelle der in den vorherigen Abschnitten beschriebenen neuronalen Schaltstellen PGE₂ eine derartige Wirkung ausüben könnte. Aufgrund der Tatsache, dass der PGE₂-Rezeptor Subtyp EP3 im MnPO stark ausgeprägt ist (Nakamura et al. 2005; Oka 2004; Yoshida et al. 2003) und eine selektive Ausschaltung dieses Rezeptors in dieser Region die Fieberantwort abschwächt (Lazarus et al. 2007), wurde der MnPO von diesen und anderen Autoren als kritische Struktur für die pyrogene Wirkung von PGE₂ bezeichnet. Da unter Kältebelastung und somit auch bei der Fieberinduktion der erregende glutamaterge Input in die relevanten MnPO-Neurone kritisch zu sein scheint, wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob sich PGE₂-vermittelte zelluläre Reaktionen dieser (GABAergen) Neurone durch Modulation Glutamat-induzierter Ca²⁺-Signale nachweisen lassen. Es wurde jedoch von einigen Autoren nicht ausgeschlossen, dass auch die benachbarten ebenfalls GABAergen Neurone in der MPA Angriffspunkt für PGE₂ sein könnten (Morrison und Nakamura 2011; Nakamura und Morrison 2011). Da auch die Neurone im medullären RPa, welche spezifisch für die Aktivierung des braunen Fettgewebes zuständig sind, über PGE₂-Rezeptoren vom Typ EP3 verfügen (Yoshida et al. 2003), wurde postuliert und untersucht, ob es sich beim RPa um ein zusätzliches „Fieberzentrum“ handeln könnte. Jedoch wurde diese Hypothese sofort wieder verworfen, da im Gegensatz zur präoptischen Region (MnPO und MPA) Mikroinjektionen von PGE₂ in den RPa keinerlei Reaktionen hervorrufen, die zu einem Fieber führen (Tanaka und McAllen 2005).

Neben den präoptisch-hypothalamischen Strukturen und den Schaltstellen der efferenten thermoregulatorischen Bahnen könnte jedoch auch eine Beeinflussung der Afferenzen

zur Fieberentstehung beitragen. Derartige Vorstellungen gibt es für den *Nervus vagus* und den *Nervus glossopharyngeus*, aber auch für afferente Nervenfasern aus der Haut (siehe Abschnitt 3.2). Da in der Phase des Fieberanstiegs ähnliche Reaktionen beobachtet werden wie nach peripherer Kältestimulation, könnte eine Aktivierung sensorischer Kaltfasern durch PGE₂ durchaus zur Fieberentstehung beitragen. Diese Hypothese wurde im Rahmen der hier durchgeführten Arbeiten experimentell untersucht (Abschnitt C).

3. Signalwege zur Fieberentstehung

Im Verlauf der letzten 20 Jahre wurde der Erforschung der möglichen Signalwege der Fieberentstehung viel Aufmerksamkeit gewidmet. Hierbei ging es weniger um das Phänomen Fieber selbst, sondern in breiterem Zusammenhang um die Frage, wie bestimmte Gehirnstrukturen bei Infektionen und systemischen, aber auch lokalen Entzündungsreaktionen dazu veranlasst werden, eine breite Palette an physiologischen Reaktionen und Verhaltensänderungen zu induzieren, die kollektiv als *sickness behavior* bezeichnet werden (Dantzer 2004; McCusker und Kelley 2013; Quan 2008; Quan und Banks 2007). Außerdem tragen die hierbei beobachteten neuroinflammatorischen Prozesse wahrscheinlich zur Entstehung klinisch relevanter Erkrankungen des Gehirns bei (Dantzer et al. 2008). Eine für diese Arbeit zentrale Frage wird auch heute noch kontrovers diskutiert, ob nämlich in der Körperperipherie gebildetes PGE₂ oder aber die induzierte Produktion von PGE₂ im Gehirn selbst für die Ausbildung des Fiebers essentiell ist (Roth und Blatteis 2014 zur Übersicht).

3.1. Der humorale Signalweg

Der humorale Signalweg zur Fieberentstehung beruht auf der klassischen Beobachtung, dass eine Substanz aus Überständen von LPS-stimulierten Leukozyten bei Kaninchen Fieber erzeugte (Beeson 1948). Pathogene bzw. Molekülstrukturen aus Pathogenen wurden gemäß dieser Hypothese als „exogene Pyrogene“ bezeichnet, während körpereigene Substanzen quasi die eigentlichen Fieber erzeugenden Substanzen seien und demzufolge als endogene Pyrogene bezeichnet wurden (Kluger 1991). Diesen Pyrogenen

wurde die Eigenschaft zugesprochen als Hormon-artige Botenstoffe im Blut zu zirkulieren und auf eine zunächst unklare Art und Weise direkt das Gehirn zu beeinflussen, um Fieber auszulösen.

3.1.1. Exogene und endogene Pyrogene

Das Wissen um den Wirkungsmechanismus der „exogenen Pyrogene“ wurde durch die Entdeckung und Charakterisierung der so genannten *Toll-like* Rezeptoren (TLRs) entscheidend verbessert (Aderem und Ulevitch 2000; Beutler 2009; Mogensen 2009). Diese Rezeptorfamilie des angeborenen Immunsystems ist in der Lage hoch konservierte Pathogen-assoziierte Molekülstrukturen (PAMPs) zu erkennen und eine sofort einsetzende intrazelluläre Signalkaskade zu induzieren, was zur Bildung zahlreicher Moleküle führt, zu denen auch die körpereigenen „endogenen Pyrogene“ gehören. Man kennt 13 unterschiedliche TLRs. Ein Teil ist an der Zelloberfläche lokalisiert (TLRs 1, 2, 4, 5, 6), andere (TLRs 3, 7, 8 und 9) werden auf der luminalen Seite endosomaler oder lysosomaler Membranen exprimiert (Blasius und Beutler 2010; Mogensen 2009). Die an der Zelloberfläche lokalisierten TLRs erkennen hauptsächlich bakterielle oder fungale Zellwandbestandteile, intrazelluläre TLRs dienen der Erkennung von Nukleinsäuren viralen oder auch bakteriellen (intrazelluläre Bakterien) Ursprungs (Blasius und Beutler 2010; Uematsu und Akira 2006). Nachdem ein PAMP von seinem spezifischen TLR erkannt wurde, erfolgt eine Rezeptordimerisierung. Hierbei können Homodimere, aber auch Heterodimere entstehen (Mogensen 2009; Uematsu und Akira 2006). Bei den PAMPs handelt es sich um die exogenen Pyrogene. Das bekannteste und am häufigsten für experimentelle Studien eingesetzte PAMP / exogene Pyrogen ist zweifelsfrei LPS gram-negativer Bakterien (Blatteis 2006; Kluger 1991; Roth und Blatteis 2014). LPS ist der natürliche Ligand von TLR4. Im Verlauf der letzten Jahre wurden jedoch auch zahlreiche weitere exogene Pyrogene eingesetzt, um molekulare Mechanismen der jeweiligen Fieberentstehung zu charakterisieren (Damm et al. 2012; Damm et al. 2014; Greis et al. 2007; Greis et al. 2009; Knorr et al. 2008; Welsch et al. 2012). TLRs sind Transmembranproteine, deren intrazelluläre Domäne Ähnlichkeiten zum Interleukin-1 (IL-1)-Rezeptor aufweist (Mogensen 2009). Nach Bindung des jeweiligen PAMP / exogenen Pyrogens an sein Rezeptor-Dimer erfolgt eine intrazelluläre

Signaltransduktion, die zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B führt. Dieser wandert nun in den Kern der aktivierten Zelle und sorgt für die Transkription zahlreichen Zielgene. Hierzu gehören Zytokine, Chemokine, COX-2, mPGES-1 und zahlreiche weitere inflammatorische Moleküle (Barnes und Karin 1997).

Einige der auf diesem Weg gebildeten Zytokine repräsentieren die klassischen „endogenen Pyrogene“, besonders IL-1 β , IL-6 und TNF- α (Conti et al. 2004; Kluger 1991; Roth und De Souza 2001). Nach der klassischen Vorstellung sind es eben diese Zytokine, die als endogene Pyrogene fungieren, indem sie über das Blut bestimmte Gehirnstrukturen erreichen, um dort Fieber auszulösen. Die Vorgänge, die zur Bildung von IL-1 β , IL-6 und TNF- α und deren Freisetzung in die Blutbahn führen, sind in Abbildung 5 schematisch dargestellt. LPS, das beim Zerfall oder der Teilung eines gram-negativen Bakteriums frei wird, bindet zunächst an ein LPS-bindendes Protein. Dieser Komplex wiederum bindet an membrangebundenes oder freies CD14, worauf es zur Aktivierung von TLR4 kommt. Dies führt zur Phosphorylierung und Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B in den Zellkern und der anschließenden Transkription der Gene für die Fieber erzeugenden Zytokine. Schließlich erfolgen die Translation und die Abgabe der entsprechenden Proteine in die Blutbahn.

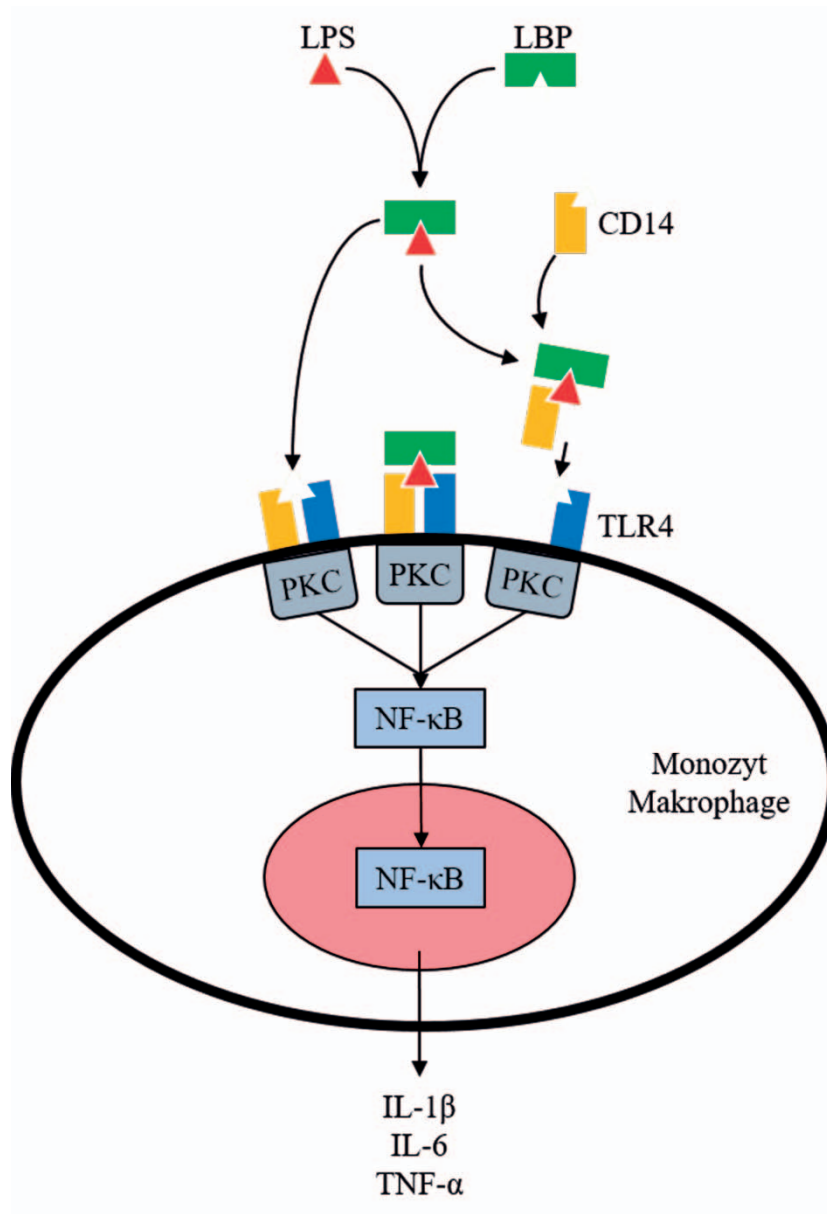


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Vorgänge, die zur Bildung von endogenen Pyrogenen nach Stimulation eines Monozyten / Makrophagen mit einem exogenen Pyrogen (LPS) führen (nähere Erläuterungen: siehe Text).

Abkürzungen: CD14 = Cluster of Differentiation 14; IL = Interleukin; LBP = LPS bindendes Protein; LPS = Lipopolysaccharid; NF-κB = Nuclear Factor kappa B; PKC = Proteinkinase C; TLR4 = Toll-like Rezeptor 4; TNF = Tumor Nekrose Faktor.

3.1.2. Der Transport des Fiebersignals über die Blut-Hirn-Schranke

Dass es sich bei den erwähnten Zytokinen (IL-1 β , IL-6 und TNF- α) um die postulierten endogenen Pyrogene handelte, basierte auf zahlreichen experimentellen Untersuchungen. So kann man durch periphere Gabe einzelner Zytokine bei Versuchstieren oder auch beim Menschen Fieber auslösen (Dinarello 1996; Goldbach et al. 1996; Harré et al. 2002; Kluger 1991; Roth und Zeisberger 1995; Tripp et al. 1998). Nach Gabe eines exogenen Pyrogens tauchen diese Zytokine in sehr charakteristischer Sequenz und Kinetik in der Blutbahn auf (Janský et al. 1995). Schließlich führt eine Hemmung der Bildung oder Antagonisierung der biologischen Wirkung einzelner Zytokine zu einer Abschwächung der Fieberreaktion (Kluger 1991; Roth und De Souza 2001). Da jedoch bestimmte Gehirnstrukturen zur Auslösung einer Fieberreaktion durch ein gegebenes endogenes Pyrogen beeinflusst und damit erreicht werden müssen, ergab sich folgendes Problem. Zytokine als hydrophile Proteine können die Blut-Hirn-Schranke nicht ohne weiteres überwinden. Zur Lösung dieses Problems richtete sich die Aufmerksamkeit zunächst auf Strukturen mit einer unvollständigen Blut-Hirn-Schranke, den aufgrund ihrer Lokalisation so bezeichneten zirkumventrikulären Organen (Abbildung 6). Diese verfügen über Blutkapillaren vom fenestrierten Typ, was einen Übertritt der erwähnten Zytokine in das Gehirn in diesen Regionen möglich macht.

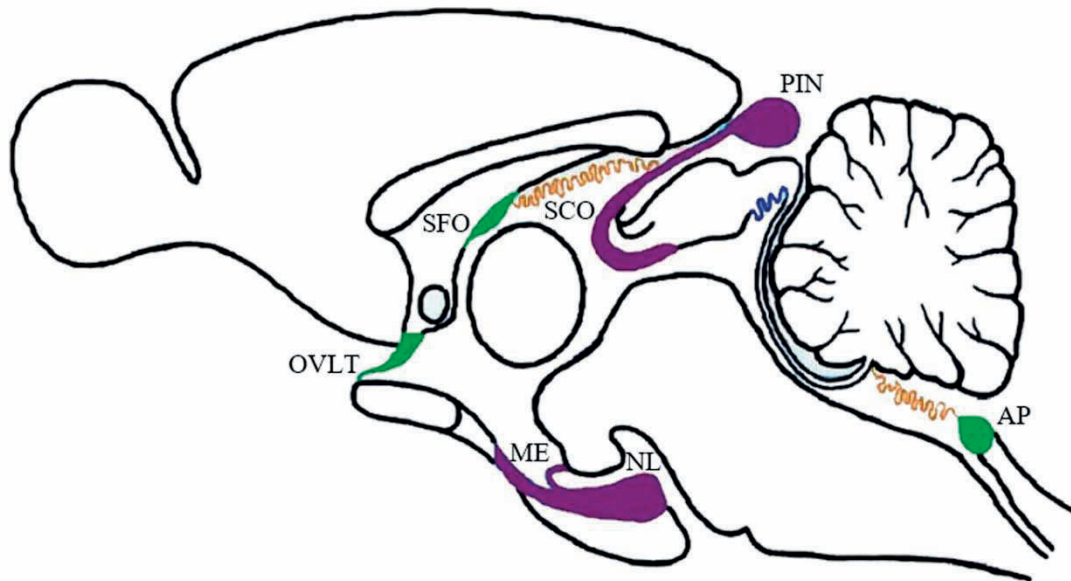


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Lokalisation der zirkumventrikulären Organe (farbig hervorgehoben; grün = sensorisch; lila = sekretorisch), Strukturen mit unvollständiger Blut-Hirn-Schranke, das OVLT liegt in unmittelbarer Nachbarschaft zur präoptischen Region, die für die Fieberentstehung essentiell ist.

AP = Area postrema; ME = Median eminence, Eminentia mediana; NL = neural lobe, Hypophysenvorderlappen; PIN = Pinealorgan; OVLT = Organum vasculosum laminae terminalis; SCO = Subcommissuralorgan; SFO = Subfornikalorgan

Wegen seiner Lage in unmittelbarer Nachbarschaft zu der für die Ausbildung von Fieber kritischen präoptischen Region wurde dem OVLT traditionell eine Rolle als Eintrittspforte für endogene Pyrogene in das Gehirn zugeschrieben (Blatteis 1992). So führte eine elektrolytische Zerstörung dieser Struktur zum Ausbleiben einer Fieberreaktion nach peripherer Injektion von LPS (Blatteis et al. 1983). Außerdem wurden im OVLT Rezeptoren für IL-1 β , IL-6 und TNF- α und sogar einzelne TLRs in hoher Dichte nachgewiesen. Entsprechend sind durch periphere Injektionen von Zytokinen oder exogenen Pyrogenen zelluläre Reaktionen im Bereich des OVLT nachweisbar, die man in Zusammenhang mit dem Auftreten von Fieber bringen kann (Harré et al. 2002; Ott et al. 2010; Ott et al. 2012; Roth et al. 2004; Rummel et al. 2004). Die durch Zytokine oder sogar exogene Pyrogene induzierten Signale würden über nachgewiesene synaptische Verbindungen zum MnPO oder durch Diffusion von sekundär gebildeten Mediatoren (PGE₂) in die unmittelbare Umgebung zur Fieberentstehung führen. Wie bereits erwähnt steigen die Konzentrationen an PGE₂ im Blut parallel zur Fieberentstehung an (Greis et al. 2007; Li et al. 2006; Rotondo et al. 1988; Sehic et al. 1996). Außerdem wurde von mehreren Autoren postuliert, dass peripher

gebildetes PGE₂ zumindest für die Entstehung der frühen Fieberphase verantwortlich ist (Li et al. 2006; Steiner et al. 2006). Da es im Bereich des OVLT auch Rezeptoren für PGE₂ gibt (Oka 2004) wäre das OVLT auch ein potenzieller Angriffspunkt für zirkulierendes PGE₂ und es sollten sich zelluläre Reaktionen des OVLT gegenüber PGE₂ nachweisen lassen. Diese Hypothese wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit experimentell untersucht.

Die zentrale Rolle des OVLT bei der humoralen Hypothese zur Fieberentstehung hat sich im Verlauf der letzten Jahre relativiert. Verschiedene experimentelle Studien konnten zeigen, dass Zellen, welche die Blut-Hirn-Schranke bilden, als wichtige Zielstruktur für zirkulierende exogene und endogene Pyrogene fungieren. Hierbei handelt es sich in erster Linie um Endothelzellen der Hirngefäße (Matsumura und Kobayashi 2004), aber auch um perivaskuläre Zellen, eine mit Blutgefäßen des Gehirns assoziierte Makrophagenpopulation (Schiltz und Sawchenko 2002). Auch diese Zellen sind mit Rezeptoren für diverse Zytokine und PAMPs ausgestattet, speziell auf der dem Gefäßlumen zugewandten Seite. Eine Stimulation dieser Rezeptoren durch zirkulierende inflammatorische Substanzen transformiert beide Zelltypen zu einer Art Relais-Station, welche das inflammatorische Signal direkt in das Gehirn transportieren können. Hierzu wird in diesen Zellen durch Zytokine oder aber direkt durch LPS und andere PAMPs eine koordinierte Bildung der induzierbaren Enzyme der PGE-Synthese (COX-2, mPGES-1) verursacht, was zu einer massiven Bildung von PGE₂ vor allem durch das Endothel der Hirngefäße führt (Engström et al. 2012; Eskilsson et al. 2014; Roth 2015; Vasilache et al. 2015; Wilhelms et al. 2014). Das hierbei gebildete PGE₂ wird auf der abluminalen Seite der Gefäße direkt in das Hirnparenchym abgegeben und kann so beispielsweise in der präoptischen Region zur Entstehung oder aber zumindest zur Aufrechterhaltung des Fiebers beitragen. Eine derartige induzierte Bildung von PGE₂ vor allem durch Endothelzellen der Hirngefäße findet jedoch bei systemischen Entzündungsreaktionen nicht nur im Bereich der präoptischen Region statt (Rummel et al. 2005; Rummel et al. 2016). Welche Funktionen das auf diesem Weg gebildete PGE₂ in anderen Hirnregionen, zum Beispiel im zerebralen Cortex, hat, muss in künftigen Untersuchungen noch geklärt werden (Lacroix et al. 2015).

3.2. Der nervale Signalweg

Die ersten experimentellen Hinweise, dass es neben dem humoralen auch einen nervalen / neuronalen Signalweg zur Übermittlung inflammatorischer Signale aus der Körperperipherie in das Gehirn geben könnte, ergaben sich aus Transsektionsstudien afferenter Nerven, wodurch bestimmte Krankheitssymptome abgeschwächt werden konnten (Watkins et al. 1995). Da direkte Effekte von Entzündungsmediatoren beispielsweise auf afferente Schmerzfasern durchaus etabliert sind (Watkins et al. 1994), wäre ein solcher Mechanismus durchaus denkbar. Speziell im Bezug zur Fieberreaktion kam es zum Teil zu widersprüchlichen Befunden, sodass ein derartiger Mechanismus kontrovers diskutiert wird (Quan 2008; Romanovsky 2004; Roth und Blatteis 2014). Die wichtigsten Befunde zu dieser Thematik und deren Bezug zur hier vorgelegten Arbeit sollen im Folgenden kurz vorgestellt werden.

3.2.1. Die Rolle des *Nervus vagus*

Der Fokus wissenschaftlicher Untersuchungen zur neuronal vermittelten inflammatorischen Signalübertragung in das Gehirn richtete sich zunächst auf den *N. vagus*. In der Tat wurden etliche Studien publiziert, in denen eine bilaterale Vagotomie unterhalb des Diaphragmas zur Abschwächung von Fieber, anderen Krankheitssymptomen und der Expression diverser inflammatorischer Moleküle im Gehirn LPS-behandelter Versuchstiere führte (Bret-Dibat et al. 1995; Goldbach et al. 1997; Hansen et al. 1998; Hansen et al. 2001; Sehic und Blatteis 1996; Simons et al. 1998). Auch eine Erhöhung der Impulsfrequenz vagaler Nervenfasern aus dem Bereich des hepatoportal Systems wurde nach lokaler Gabe von IL-1 β beschrieben (Nijima 1996). Bei der Frage, welcher unter Bedingungen lokaler oder systemischer Inflammation gebildete Entzündungsmediator letztendlich für die Aktivierung von afferenten Fasern des *N. vagus* verantwortlich ist, fokussierte sich die Aufmerksamkeit jedoch schon bald auf PGE₂ (Li et al. 2006; Perlik et al. 2005). Eine derartige PGE₂-vermittelte Aktivierung vagaler Afferenzen scheint speziell an der Induktion der frühen Fieberphase beteiligt zu sein, während der humorale Signalweg im LPS-Modell eher die verzögert einsetzende zweite Fieberphase vermittelt (Blatteis 2006; Roth und Blatteis 2014). Eine schnelle

Information des Gehirns über ein Entzündungsgeschehen in der Körperperipherie durch afferente Nerven könnte in der Tat zu einer besseren Koordination der einzuleitenden gegenregulatorischen Abwehrmaßnahmen führen (Zeisberger 1999), an denen wiederum Efferenzen des *N. vagus* beteiligt zu sein scheinen (Tracey 2002, 2007, 2009).

3.2.2. Evidenz für eine Beteiligung weiterer sensorischer Afferenzen (*N. trigeminus*, Afferenzen von Hautnerven)

Es stellte sich nunmehr die Frage ob sich auch für sensorische Afferenzen anderer Nerven derartige Eigenschaften nachweisen lassen. So konnte in einer Studie gezeigt werden, dass lokale Injektionen von Diclofenac (COX-Inhibitor) oder eines Lokalanästhetikums in das Innervationsgebiet der *N. trigeminus* in der Mundhöhle, das durch Injektion von LPS in eben dieses Gebiet induzierte Fieber abschwächten (Navarro et al. 2006). Bereits vorher hatten Ross et al. 2000 gezeigt, dass man die Fieberreaktion, die nach Gabe von LPS in eine subkutane Luftkammer induziert wird, durch ein Lokalanästhetikum deutlich reduziert, was für einen Beitrag kutaner afferenter Nerven an der inflammatorischen Signalübertragung in das Gehirn spricht. In einer nachfolgenden Studie konnte gezeigt werden, dass man durch Gabe des COX-Inhibitors Diclofenac in niedriger Dosierung in die Luftkammer die LPS-induzierte Fieberantwort ebenfalls abschwächen kann (Rummel et al. 2005). Hierbei ist festzuhalten, dass dieselbe Dosis an Diclofenac unwirksam war, wenn Sie an einer anderen Stelle subkutan injiziert wurde. All diese Befunde sprechen dafür, dass PGE₂ in der Körperperipherie zumindest in bescheidenem Umfang zur Fieberinduktion durch Stimulation afferenter Nervenfasern beiträgt (Abbildung 7). Welcher Natur diese Nervenfasern sind, konnte anhand dieser Studien nicht festgelegt werden. Die Beantwortung dieser Frage gehörte zu den zentralen Zielen der vorliegenden Arbeit.

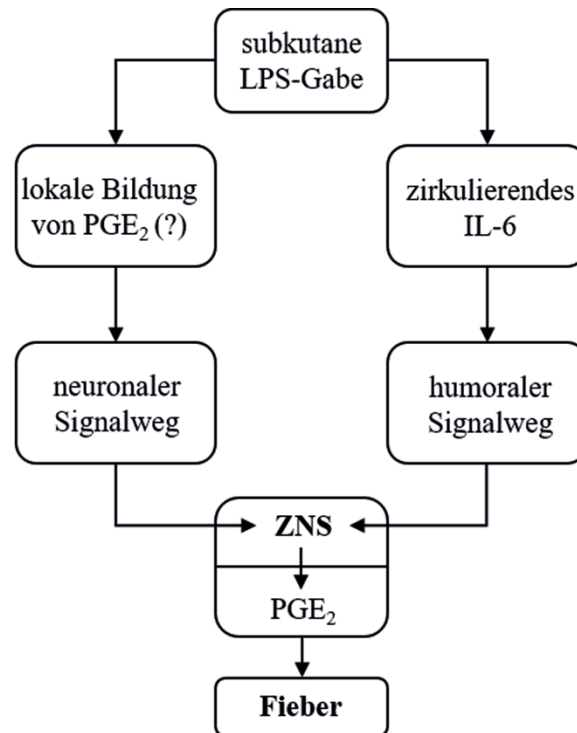


Abbildung 7: Schematische Darstellung der beiden Signalwege, die nach Injektion von LPS in eine subkutane Luftkammer Fieber erzeugen

Links der möglicherweise über PGE₂ aktivierte neuronale Signalweg über Hautafferenzen, rechts der durch endogene Pyrogene (z.B. IL-6) getragene humorale Signalweg.

4. Zellkultur als Alternative zum Tierversuch

Die Durchführung von Tierversuchen in der biomedizinischen Forschung wird heutzutage kontrovers diskutiert und der Suche nach alternativen Methoden wird sehr viel Aufmerksamkeit gewidmet. Das so bezeichnete „3R-Prinzip“ wurde in diesem Zusammenhang bereits im Jahre 1959 von William Russell und Rex Burch in ihrem Buch „The Principles of Humane Experimental Technique“ entwickelt und vorgestellt (Russell und Burch 1959). Die „3R“ stehen hierbei für die Begriffe *Replacement*, *Reduction* und *Refinement* und beziehen sich auf Maßnahmen zur Vermeidung, Verringerung und Verbesserung von tierexperimentellen Untersuchungen. Für den in der biomedizinischen Forschung tätigen Wissenschaftler ergeben sich hieraus die Fragen, ob ein geplanter Tierversuch durch eine alternative Methode ersetzbar ist, ob die Zahl der für eine bestimmte Fragestellung vorgesehenen Versuchstiere reduzierbar ist, und ob man

Belastungen für Versuchstiere im Rahmen einer durchzuführenden Untersuchung verringern kann.

Die im Literaturteil dieser Arbeit beschriebenen Erkenntnisse zur funktionellen Organisation des Thermoregulationssystems der Säuger oder zu den Signalwegen für die Entstehung von Fieber und *sickness behavior* beruhen im Prinzip ausschließlich auf tierexperimentellen Untersuchungen. Hierzu wurden beispielsweise Mikroinjektionen relevanter Substanzen in bestimmte Hirnstrukturen durchgeführt und die hierdurch induzierten thermoregulatorischen Reaktionen gemessen (Nakamura et al. 2004; Nakamura und Morrison 2011; Tanaka et al. 2002; Tanaka et al. 2006). Zur Erforschung der Mechanismen, die zur Fieberentstehung führen, wurden den Versuchstieren exogene oder auch endogene Pyrogene peripher bzw. zentral injiziert und die hierdurch ausgelöste Fieberreaktion im Idealfall telemetrisch aufgezeichnet (Hübschle et al. 2006; Lazarus et al. 2007; Steiner et al. 2006). Modulationen des durch Pyrogene induzierten Fiebers wurden später auch durch den Einsatz gentechnisch veränderter Tiere analysiert, um die Beteiligung bestimmter Moleküle nachzuweisen (Engblom et al. 2003; Leon 2002; Li et al. 1999; Schneiders et al. 2015; Welsch et al. 2012). Da es bei derartigen Untersuchungen um das komplexe Zusammenspiel verschiedener intakter Organsysteme ging (Immunsystem, Gehirn, Blutgefäße, Muskulatur und andere thermoregulatorisch relevante Effektororgane), waren die gewonnenen Erkenntnisse auch nicht durch andere Methoden erzielbar.

Nachdem nun jedoch die exakten Gehirnstrukturen identifiziert waren, die für Thermoregulation und neuro-immune Interaktionen entscheidend sind, richtet sich das Augenmerk vermehrt auch auf molekulare und zelluläre Mechanismen, denen beobachtete Effekte zugrunde liegen. Auch für derartige Fragestellungen kann der tierexperimentelle Ansatz gewählt werden. So ist es möglich, nach geeigneter Stimulation, bestimmte Zielstrukturen präparativ zu gewinnen und mittels entsprechender Methoden (Immunhistologie, PCR, Western Blot etc.) molekular und biochemisch zu untersuchen (Damm et al. 2011; Damm et al. 2013; Koenig et al. 2014; Schneiders et al. 2015). Zu derartigen Untersuchungen lassen sich zumindest teilweise Alternativen entwickeln, mit deren Hilfe tierexperimentelle Untersuchungen ersetzt und reduziert werden können. So ist es möglich, von bestimmten Gehirnstrukturen Primärkulturen (Jurzak et al. 1995) oder vitale organotypische Schnittpräparate (Humpel 2015) herzustellen und experimentell zu untersuchen. Derartige Untersuchungen können sich

auf direkte zelluläre Reaktionen beziehen, wie z.B. elektrische Aktivität von Neuronen (Dewald et al. 2002; Riediger et al. 2001; Shibata und Blatteis 1991) oder Veränderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen in Neuronen, Astrozyten oder anderen Gliazelltypen (Gebke et al. 1998; Ott et al. 2010; Wuchert et al. 2009). Solche Messungen erfolgen nach entsprechender Stimulation mit geeigneten Substanzen oder durch physikalische Stimuli (Temperatur, Osmolarität etc.). Weiterhin besteht die Möglichkeit, mit derartigen Präparaten / Kulturen die Stimulus-induzierte Freisetzung bestimmter Botenstoffe zu analysieren bzw. immunhistologische Untersuchungen oder Expressionsstudien durchzuführen (Ott et al. 2012; Wuchert et al. 2008). Da man von einem einzigen Versuchstier zahlreiche Kulturen gewinnen kann, besteht somit die konkrete Möglichkeit zur Reduktion und zum Ersatz von tierexperimentellen Untersuchungen. Die Einsetzbarkeit von Primärkulturen thermoregulatorisch relevanter Strukturen des peripheren (Spinalganglien) und zentralen (MnPO, OVLT) Nervensystems zur Gewinnung neuer Erkenntnisse zu Fragestellungen mit physiologischem und neuroimmunologischem Hintergrund wurde im Rahmen dieser Arbeit experimentell untersucht und analysiert.

C. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

1. Publikation 1: Prostaglandin D₂ modulates calcium signals induced by prostaglandin E₂ in neurons of rat dorsal root ganglia

Veröffentlicht in: Neuroscience Letters 597: 159-163 (2015)

**Prostaglandin D₂ modulates calcium signals induced by
prostaglandin E₂ in neurons of rat dorsal root ganglia**

Daniela Ott, Björn Simm, Eric Pollatzek, Rüdiger Gerstberger, Christoph Rummel,

Joachim Roth

Department of Veterinary-Physiology and -Biochemistry, Justus-Liebig University

Giessen,

Frankfurter Strasse 100, D-35392 Giessen, Germany

Corresponding author:

Dr. Joachim Roth

Department of Veterinary-Physiology and -Biochemistry, Justus-Liebig-Universität

Giessen

Frankfurter Strasse 100, D-35392 Giessen, Germany

Phone: +49-641 - 99 - 38850

Fax: +49-641 - 99 - 38159

E-mail: joachim.roth@vetmed.uni-giessen.de

ABSTRACT

Fever in response to a localized subcutaneous stimulation with a low dose of lipopolysaccharide (LPS) can be attenuated by co-administration of a local anaesthetic or the non-selective cyclooxygenase (COX) inhibitor diclofenac at doses, which don't exert systemic effects when injected at sites remote from the area of inflammatory stimulation. These results suggest a participation of neuronal afferent signals mediated by COX-products in the manifestation of fever under these conditions. We therefore measured intracellular Ca^{2+} -concentrations in cultured neurones from rat dorsal root ganglia (DRG) stimulated with the pyrogenic mediator prostaglandin E_2 (PGE_2), the anti-inflammatory and antipyretic mediator PGD_2 , mixtures of both PGs, and menthol using the fura-2 ratio imaging technique. Neurons could be grouped according to their size with diameters of about $15\mu\text{m}$ (small), $35\mu\text{m}$ (medium sized), or $55\mu\text{m}$ (large). 96 out of 264 neurons responded to PGE_2 with pronounced Ca^{2+} -signals, 53 of them being also responsive to menthol, indicative of their function as cold-sensors. 80% of these neurons belonged to the medium sized group. In a next experiment we tested whether Ca^{2+} -signals of PGE_2 responsive neurons were modulated by PGD_2 . In 60% of all neurons investigated ($n = 57$) the strength of the PGE_2 -induced Ca^{2+} -signals was reduced by co-administration of PGD_2 . This effect was also observed in those neurons that were responsive to PGE_2 and menthol ($n=23$; $p < 0.001$). This observation indicates antagonistic effects of PGE_2 and PGD_2 on a neuronal pathway that involves cold sensors and is activated during a localized subcutaneous inflammation. This finding might provide an explanation for the reported antipyretic and anti-inflammatory capacities of PGD_2 .

Dorsal root ganglia; cold sensors; prostaglandin E_2 ; prostaglandin D_2 ; calcium imaging; localized cutaneous inflammation;

1. Introduction

Peripheral cold-sensitive neurons increase their discharge patterns in response to cooling [2] and to menthol, a natural stimulant of afferent cold fibers [19]. The responsible ion channel TRPM8 belongs to the TRP (transient receptor potential) family [14] and its functional role as a universal cold receptor in the mammalian thermoregulatory system has been established [1], although there seem to exist DRG neurons responsive to cold in absence of TRPM8 [8]. Short-term cultures of somata from dorsal root ganglia (DRG) are frequently used to study the properties of peripheral cold receptors since they express the channels which are present in the endings of the respective nerve fibers under natural conditions [11, 15]. Recording an increase of intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) has frequently been used as experimental read out for stimulus-induced activation of cultivated DRG neurons [3, 10, 23] or of neuro-glial primary cultures from specific brain sites involved in the neuronal responses to systemic inflammation [12, 13, 21].

In this context, there seem to be interactions between cold sensitivity and inflammation at the cellular level due to functional co-expression of TRPM8 with receptors for various mediators of inflammation including PGE₂ in sensory DRG neurons [6]. In previous *in vivo* studies we obtained some evidence that cutaneous afferent nerve fibers can, to a small degree, contribute to the manifestation of fever in an experimental model of localized subcutaneous inflammation. Injections of low dose of LPS into a subcutaneous compartment resulted in a febrile response that could be attenuated by co-administration of a local anaesthetic [16]. We speculated that some inflammatory mediator might have activated cutaneous cold-sensitive afferent nerve fibers. The activated cold-sensory neurons, in turn, could have evoked the characteristic pattern of cold-defence reactions, which are typical for the rising phase of fever [17]. PGE₂ turned out to be a likely candidate for an effect like this. The febrile response, which was induced by a local subcutaneous injection of LPS could be attenuated by co-administration of a low dose of a cyclooxygenase (COX)-inhibitor into the subcutaneous site of inflammation. The same amount of the COX-inhibitor was ineffective when injected into another site remote from the locus of LPS-injection [18]. Similar observations were reported by another group, in this case for periodontal tissue and the respective afferent fibers of the trigeminal nerve [9].

One goal of this study was thus to investigate by means of Ca^{2+} -imaging experiments, whether there is indeed a menthol-responsive population of DRG-neurons, which can also be activated by PGE_2 . We further aimed to test, whether PGE_2 -evoked Ca^{2+} -responses of DRG neurons are modulated (i.e. attenuated) by the anti-inflammatory PGD_2 , which also has antipyretic / cryogenic capacities [4].

2. Materials and Methods

2.1. Preparation and cultivation of DRG cell

Male Wistar rats (5 weeks old) obtained from an in-house breeding colony were used for all experiments, with parent animals originating from Charles River WIGA (Sulzfeld, Germany). Animal care, breeding and experimental procedures were conducted according to the guidelines approved by the Hessian Ethical Committee (approval numbers GI 468_M and GI 487_M). Room temperature was controlled at $22 \pm 1^\circ\text{C}$ and relative humidity of 50%, and artificial lights were on from 7:00 AM to 7:00 PM.

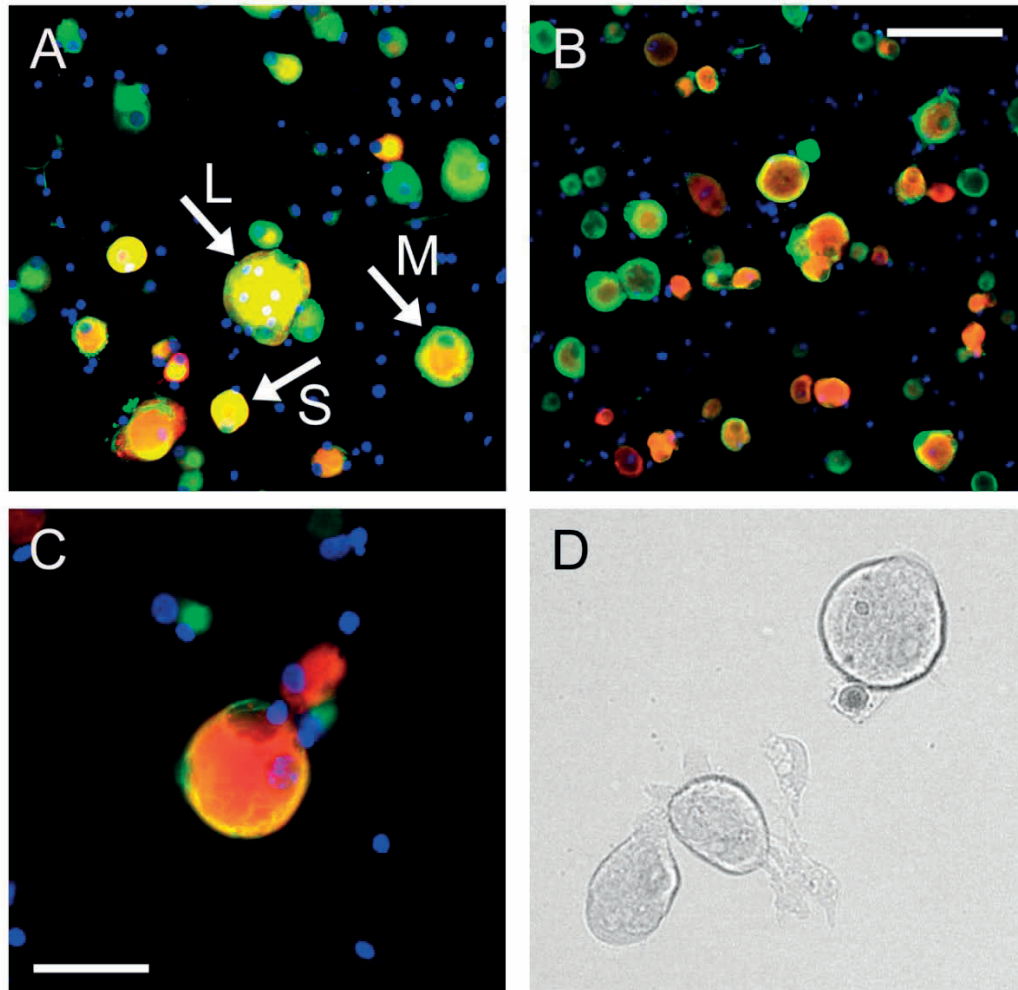
Rats were killed by cervical dislocation. The spinal column was opened and five to seven DRG along the vertebral column were removed under aseptic conditions and transferred to Petri dishes filled with cold, oxygenated GBSS (Gey's Balanced Salt Solution; Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany) containing 0.5% D-glucose (Sigma Aldrich). The isolated DRG were transferred into oxygenated HBSS (Hanks Balanced Salt Solution, without Ca^{2+} and Mg^{2+} ; Biochrom GmbH, Berlin, Germany) supplemented with 20 mM HEPES (Sigma Aldrich Chemie GmbH) at pH 7.4. The supernatant was removed, and the DRG were enzymatically digested in 5 mg/ml dispase II (Sigma Aldrich Chemie GmbH) and 2.5 mg/ml collagenase (CLS II; Biochrom GmbH) dissolved in oxygenated HBSS for 1 hour at 37°C . After enzymatic treatment the cells were dissociated by trituration and washed in HBSS containing 1 mM EDTA (Sigma Aldrich Chemie GmbH) to inactivate the enzymes. After centrifugation the EDTA was removed by washing in complete medium, which consisted of Neurobasal A (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany) supplemented with 2% B27, penicillin (100 U/ml) / streptomycin (0.1 mg/ml) and 2 mM L-glutamine (Life Technologies GmbH). Finally the cells were once more centrifuged and resuspended in complete medium with a cell

number of 75.000 cells/ml and plated onto poly-L-lysine (0,1 mg/ml; Biochrom GmbH) coated glass coverslips (Menzel, Braunschweig, Germany). Cells were cultured in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air at 37°C and the medium was exchanged after 4 hours to remove cellular debris. Measurements of intracellular calcium and immunocytochemical characterisation were always performed at the following day. The investigated neurons [see: supplementary Figure 1] were grouped according to their size with diameters of about 15µm (small), 35µm (medium sized), or 55µm (large).

2.2. Measurement of intracellular calcium

Cultivated DRG cells were loaded with 2 µM fura-2-AM (Life Technologies GmbH) in complete medium for 45 min in a humidified atmosphere of 5% CO₂ / 95% air at 37 °C. For intracellular Ca²⁺-measurements, the coverslips were placed under an inverted microscope (IMT-2; Olympus GmbH, Hamburg, Germany) in a specially constructed Teflon® culture chamber and superfused with Ca²⁺-imaging buffer consisting of 5 mM HEPES, 130mM NaCl, 5mM KCl, 1.0mM MgCl₂, 1.25mM CaCl₂ and 10mM D-glucose (Sigma-Aldrich Chemie GmbH), at pH 7.4 with a flow rate of 2.0 ml/min. Fluorescence measurements were performed using a filterwheel-based excitation system and analyzed with MetaFluor 7.7.8.0 software (Visitron GmbH, Puchheim, Germany). After defining regions of interest for single cells by a continuously variable aperture, the time course of emitted fluorescence (>515 nm) after alternating excitations at 340 and 380 nm, respectively, was recorded using a Spot Pursuit digital CCD-camera (Model 23.0, Visitron GmbH). The 340 / 380 ratios proportional to [Ca²⁺]_i were computed and analyzed. Measurements of [Ca²⁺]_i were performed at 37 °C. All drugs used for stimulation had been stored as stock solutions of menthol (Sigma Aldrich Chemie GmbH; 100 mM in ethanol), PGE₂ and PGD₂ (Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Germany; 1 mM in Ca²⁺-imaging buffer) at -20°C. They were diluted in Ca²⁺-imaging buffer to their working dilutions of 100 µM menthol, 10 µM PGE₂ and 10 µM PGD₂ just prior to experimentation. The doses were chosen according to preliminary recordings from pilot studies, in which several doses were tested. Drugs were applied to the recording chamber via superfusion at 2.0 ml/min for 180 seconds.

Phenotypic identification of DRG cells were carried out by immune-labelling with antibodies directed against cell-specific marker proteins as described previously [12, 21]. Examples are shown in the supplementary material to this paper (Suppl. Fig.1).



Supplementary figure 1: Examples for immunocytochemical stainings of DRG short-term cultures

a-c: Phenotypic characterization of the cells in the primary culture of DRG was performed by immunolabelling with primary antisera / antibodies directed against cell-specific marker proteins [MAP2a+b for neurons (**red**) and GFAP for glial cells (i.e. satellite glial cells, **green**)]. Secondary antisera employed were coupled to fluorophores such as Cy3 and Alexa-488. The cell nuclei were stained with DAPI (**blue**). The different cell sizes (**L**arge, **M**edium, **S**mall) are indicated with arrows (**a**). Satellite glial cells surround neuronal cell bodies result in yellow colour or some green lining around the exterior surface of the neurons (**a**, **b**). A large neuron from which the satellite glial cell was removed almost completely by enzymatic digestion is shown in (**c**). A light microscopical image of DRG neurons is shown in (**d**). **a** and **b** are shown with 20x, **c** and **d** with 40x magnification; the scale bar represents 100µm.

The immunocytochemical staining with primary antibodies and fluorophore-coupled secondary antibodies was performed as described previously [12, 21]. After the staining the cells were examined and photographed with an Olympus BX50 fluorescence microscope (Olympus GmbH, Hamburg, Germany) equipped with the appropriate filter.

2.3. Evaluation and statistics

The numbers of neurons of a given group, responsive to a defined stimulus, were expressed as a percentage (%) of all neurons investigated. Stimulus-induced transient increases of $[Ca^{2+}]_i$ were expressed as the difference between resting $[Ca^{2+}]_i$ measured prior to the respective stimulation and the stimulus-induced $[Ca^{2+}]_i$ peak (Δ ratio [340/380 nm]). A difference in Δ ratio [340/380 nm] of more than 0.05 was considered to be a stimulus-induced Ca^{2+} -signal, which can be regarded as a strict exclusion criterion. Values of Δ ratios are presented as means \pm standard error of the mean (SEM) and compared by an analysis of variance (ANOVA) followed by Scheffe's post-hoc test (Abacus Concepts, Berkeley, CA, U.S.A.).

3. Results

3.1. A population of cultured DRG neurons is responsive to PGE₂ and menthol

In the first experiment we identified a population of DRG neurons that responds to stimulation with PGE₂ and menthol with an increase of $[Ca^{2+}]_i$ (Figure 1).

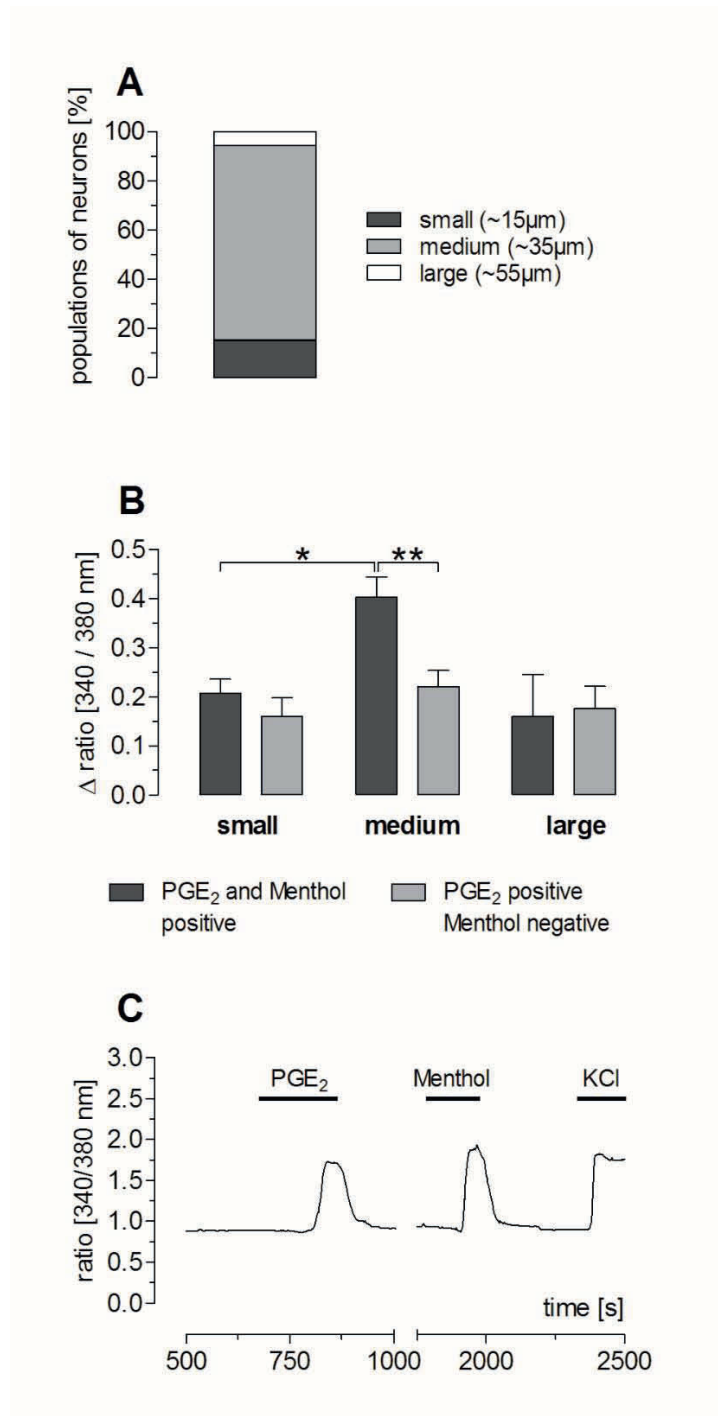


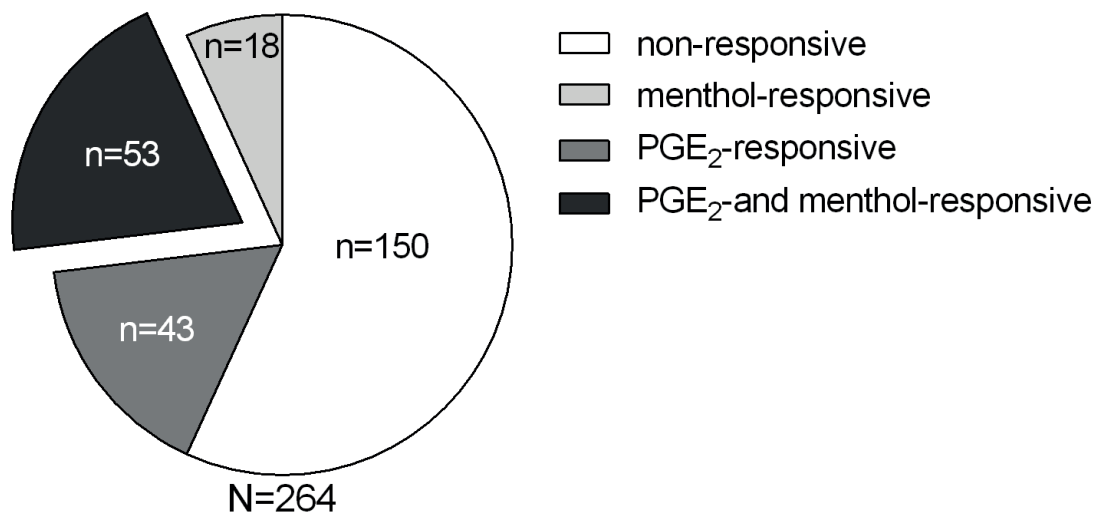
Figure 1: A population of predominantly medium-sized DRG-neurons responds to PGE₂ and menthol

A: Percentages of small ($n = 8$), medium-sized ($n = 42$) and large ($n = 3$) DRG neurons, which responded with an elevation of $[Ca^{2+}]_i$ to exposures to PGE₂ and menthol.

B: Δ ratio [340/380 nm] fluorescence values as measure of $[Ca^{2+}]_i$. Columns represent means with SEM of the responsive cells for each group of neurons (small, medium-sized, large; PGE₂/menthol-responsive or PGE₂ responsive but not menthol-responsive (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$)).

C: Example of a tracing recorded from a medium-sized DRG neuron illustrating the responsiveness to PGE₂ and menthol. Superfusion with buffer containing a high concentration of KCl (50mM) served as vitality test for neurons.

96 out of 264 neurons investigated responded to PGE₂ with pronounced Ca²⁺-signals (Supplementary Figure 2). Of the 96 PGE₂-responsive neurons, 53 also responded to menthol, indicative of their putative function as cold-sensors. About 80% of these 53 neurons belonged to the medium sized group. A special feature of the medium-sized PGE₂- and menthol-responsive DRG neurons was the significantly higher strength of the PGE₂-induced Ca²⁺-signals (Figure 1B). An example for a PGE₂- and menthol-responsive medium-sized neuron is shown in Figure 3C.



Supplementary figure 2: Identification of PGE₂- and menthol-responsive DRG-neurons

264 DRG-neurons were investigated in the first experiment. 150 of them responded neither to menthol nor to PGE₂, 18 neurons responded to menthol but not to PGE₂. 96 neurons responded to PGE₂ with an elevation of the intracellular Ca²⁺-concentration ([Ca²⁺]_i), from these 96 neurons 53 also responded to menthol, indicative of their function as cold-sensors. The responses of these 53 neurons were analyzed in more detail (cell size and strength of the Ca²⁺-concentrations).

3.2. The strength of PGE₂-induced Ca²⁺ signals is modulated by PGD₂

In a pilot experiment we tested whether two subsequent stimulations of DRG neurons with PGE₂ results in comparable increases of [Ca²⁺]_i (Figure 2). In a group of 35 PGE₂-responsive neurons two subsequent superfusions with PGE₂-containing Ca²⁺-imaging buffer evoked Ca²⁺-signals of almost identical magnitude. This observation is in line with another report on PGE₂ induced Ca²⁺-signals in DRG neurons [20].

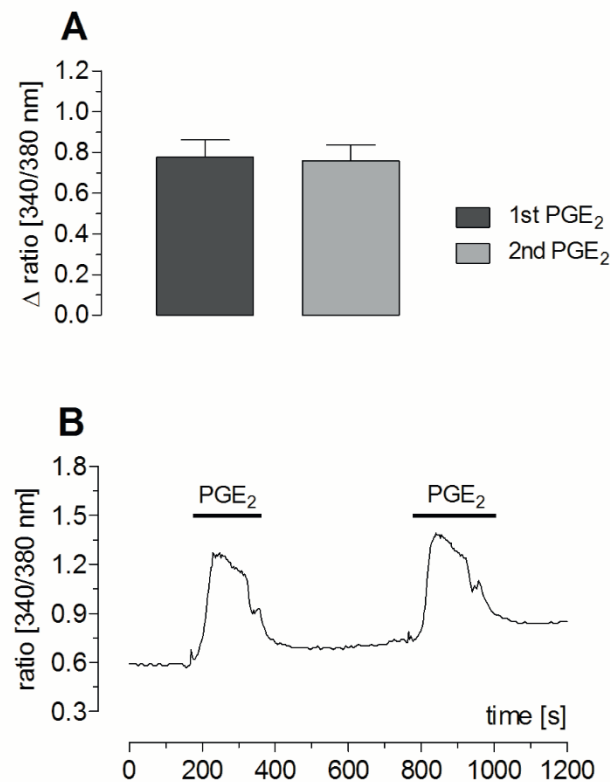


Figure 2:

A: Δ ratio [340/380 nm] fluorescence values as measure of $[Ca^{2+}]_i$. Columns represent means \pm SEM of the responses of DRG-neurons to a repeated superfusion with PGE₂-containing Ca^{2+} -imaging buffer ($n = 35$; $p > 0.05$).

B: Example of a tracing recorded from a medium-sized DRG neuron illustrating the responsiveness to two subsequent stimulations with PGE₂.

Finally, we tested whether the strength of PGE₂-induced Ca^{2+} -signals was modulated by the anti-inflammatory prostanoid PGD₂. In randomized order, DRG cultures were stimulated with PGE₂, PGD₂, or a mixture of both prostaglandins. Examples for such experiments are shown in Figure 3 A and B. In a part of the responsive cells, PGD₂ evoked small Ca^{2+} -signals. Out of 95 PGE₂-responsive neurons, 60% ($n = 57$) showed attenuated Ca^{2+} -signals (Fig. 3A, 3C), when a mixture of PGD₂ and PGE₂ was added to the superfusion buffer. In 35 cells the mixture of PGE₂ / PGD₂ caused an increase of the Ca^{2+} -signals compared to the effect of PGE₂ alone. Again, the majority of PGE₂-responsive neurons belonged to the medium sized group (73 out of 95 cells), just 10 small and 12 large neurons responded to the superfusion with PGE₂ with an increase of $[Ca^{2+}]_i$. In the medium-sized and in the large PGE₂-responsive DRG neurons the effect of co-stimulation with PGD₂ was inhibitory in more than 60% of these cells (Figure 3D).

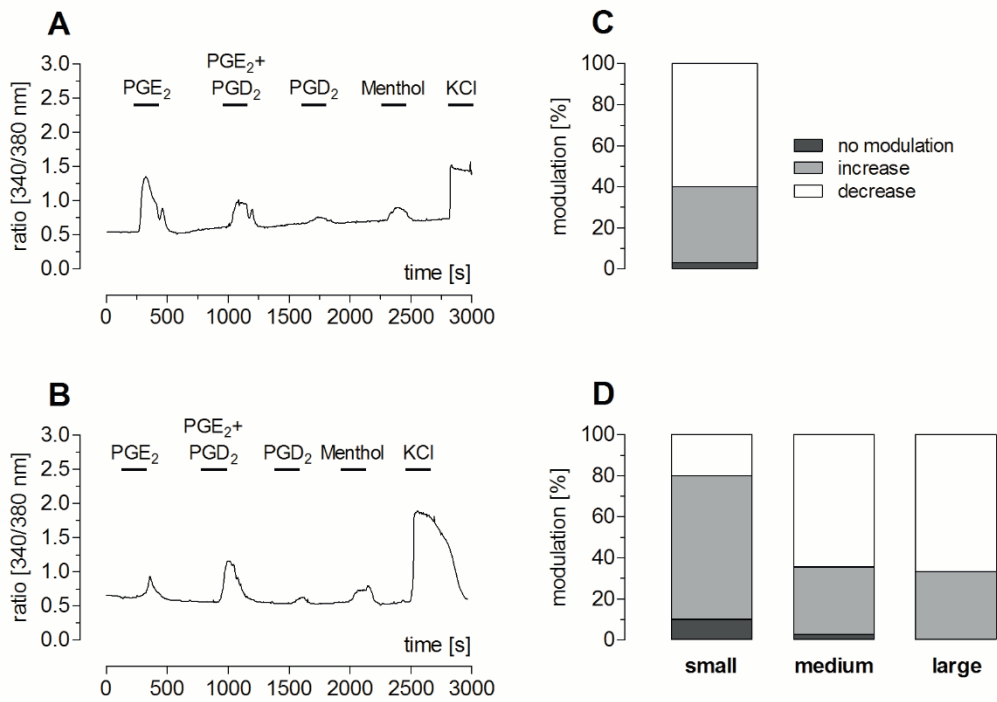


Figure 3: PGD₂ modulates the strength of PGE₂-induced Ca²⁺-signals in a population of predominantly medium-sized DRG-neurons

A, B: Example of tracings recorded from medium-sized DRG neurons illustrating the responsiveness to PGE₂, PGD₂, a mixture of PGE₂ and PGD₂, and menthol. Superfusion with buffer containing 50mM/l KCl served as vitality test for neurons at. In (A) the strength of the PGE₂-induced Ca²⁺-signal is attenuated by PGD₂, in (B) it is enhanced.

C: Percentages of PGE₂-responsive DRG neurons, in which the strength of the PGE₂-induced Ca²⁺-signal is decreased ($n = 57$), enhanced ($n = 35$) or not modulated ($n = 3$) by co-administration of PGD₂.

D: Percentages of small ($n = 10$), medium-sized ($n = 73$) and large ($n = 12$) DRG neurons, in which the strength of the PGE₂-induced Ca²⁺-signal is decreased (small: $n = 2$; medium-sized: $n = 47$; large: $n = 8$), enhanced (small: $n = 7$; medium-sized: $n = 24$; large: $n = 4$) or not modulated (small: $n = 1$; medium-sized: $n = 2$) by co-administration of PGD₂.

Only in medium-sized menthol and PGE₂ positive neurons a significant inhibitory effect of PGD₂ on PGE₂-induced signal strength was calculated (Figure 4).

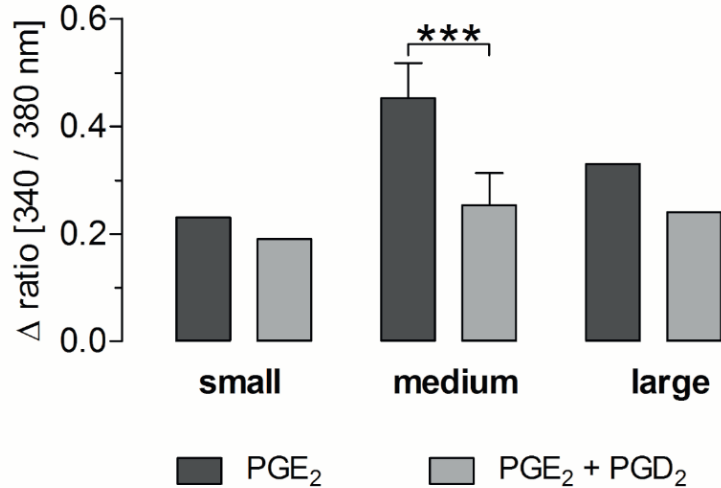


Figure 4: In medium-sized DRG-neurons responsive to PGE₂ and menthol the Ca²⁺-response to PGE₂ is reduced by PGD₂

Δratio [340/380 nm] fluorescence values as measure of [Ca²⁺]_i. Columns represent means ± SEM of the responsive cells for each group of neurons (small, medium-sized, large; PGE₂/ menthol-responsive cells) stimulated with PGE₂ or a mixture of PGE₂ and PGD₂

(***: $p < 0.001$; $n = 23$, medium-sized group).

The mean Δratio [340/380 nm] fluorescence values as measure of [Ca²⁺]_i was 0.453 ± 0.065 in medium-sized menthol and PGE₂ positive DRG neurons in response to PGE₂ alone. This value was significantly reduced to 0.253 ± 0.06 ($p < 0.001$) in these cells ($n = 23$), when they were superfused with PGE₂ plus PGD₂. In small and large PGE₂/ menthol-responsive DRG neurons a significant modulatory effect of PGD₂ on the PGE₂-induced Ca²⁺-signal strength could not be calculated. One possible reason was the small sample size for these groups of neurons due to their rare occurrence.

4. Discussion

Activation of afferent cold sensitive nerve fibers within the skin evokes the same pattern of physiological cold defence responses, which are observed during the early phase of fever [1, 17]. A putative activation of cold sensors by inflammatory mediators might therefore provide a moderate contribution to the febrile response, which is observed during a localized peripheral inflammation within a subcutaneous compartment [16, 18]. Based on evidence from in vivo experiments [9, 18] and from an unpublished conference report dealing with in vitro experiments on peripheral cold-sensitive neurons [Machida et al. 2001], PGE₂ turned out to be a candidate molecule that could have capacities to stimulate cold sensors under inflammatory conditions. Indeed, peripherally generated PGE₂ is suggested to be responsible for the early initiation of fever [17]. PGD₂, on the other hand, is another endogenous mediator produced within the inflammatory process, which exerts antipyretic and anti-inflammatory properties [4].

Using short-term cultures of DRG neurons, we aimed to detect cellular responses that are compatible with the suggested roles of PGE₂ / PGD₂ during peripheral inflammation. This approach has been used to avoid the technical difficulties to investigate the peripheral skin terminals since the somata of the primary sensory neurons express the membrane proteins which are usually transported to the axon terminal [10, 15]. Stimulus-evoked increases of [Ca²⁺]_i can be used as a measure of cellular activation in response to signal molecules or physical stimuli. We have previously used this approach to characterize the responses of cultured brain cells to various inflammatory mediators [12, 13, 21]. Using Ca²⁺-imaging techniques cultured DRG neurons including putative cold-sensors have been studied by several other groups. Mostly medium-sized DRG-neurons respond with pronounced Ca²⁺-signals to cold stimuli [23] or to menthol [11], which is a chemical activator of the native cold channel TRPM8. With regard to our central question of interest we were, indeed, able to identify a number of menthol (i.e. cold) responsive DRG-neurons, which also responded to PGE₂. Again, these neurons predominantly belonged to the medium-sized group. We cannot decide or state at this stage, whether the comparatively small group of menthol- and PGE₂-responsive peripheral neurons is able to cause any inflammation-induced thermogenesis via afferent signalling. Still, this possibility is intriguing.

Finally, we could show that PGE₂-induced Ca²⁺-signals in DRG-neurons are modulated in their strength by PGD₂. Namely, a group of medium-sized menthol- and PGE₂-responsive neurons was inhibited by co-administration of PGD₂. We consider such a modulatory effect of PGD₂ as specific for the following reasons. In several Ca²⁺-imaging studies on DRG-neurons two subsequent stimulations with cold temperature [23], menthol [11], PGE₂ [20; Figure 2 of this paper], or bradykinin [20] evoked Ca²⁺-signals of comparable magnitude. On the other hand, modulatory effects by co-stimulations with a second mediator have also been described. For example, bradykinin attenuates menthol-responses of TRPM8-expressing neurons [24]. Co-stimulation with PGE₂ or nerve growth factor increases the number of N-methyl-D-aspartate (NMDA) responsive DRG-neurons [3].

As it is the case for menthol- and PGE₂-responsive neurons, the functional relevance of the modulatory effect of PGD₂ on the strength of stimulus-induced Ca²⁺-signals in DRG-neurons, namely of putative cold-sensors, remains to be determined. However, it is tempting to speculate that the established anti-inflammatory effects of PGD₂ are not exclusively mediated via inhibition of NF-kappaB mediated expression of COX-2 and thereby negative regulation of PG-synthesis [22], but also by a direct antagonistic effect on PGE₂-mediated neuronal responses. Support for this hypothesis is provided by data showing opposing actions of the PGD₂ and PGE₂ receptor pathways for the manifestation of allergic inflammatory responses [5]. Our observation that PGD₂ itself induces an at least small increase of [Ca²⁺]_i and inhibits PGE₂-induced Ca²⁺-signals can be explained by the properties of the PGD₂-receptor subtypes DP1 and DP2. Activation of DP1 decreases, while activation of the DP2 receptor increases intracellular Ca²⁺-concentrations [7]. Thus, activation of the DP2 receptor might have caused the observed small Ca²⁺-signals in response to PGD₂, while signalling via DP1 could have accounted for the reduction of PGE₂-induced Ca²⁺-signals. Still, the precise cellular mechanisms for our observation require further investigations at the molecular level.

References

- [1] M. C. Almeida, T. Hew-Butler, R. N. Soriano, S. Rao, W. Wang, J. Wang, N. Tamayo, D. L. Oliveira, T. B. Nucci, P. Aryal, A. Garami, D. Bautista, N. R. Gavva, A. A. Romanovsky, Pharmacological blockade of the cold receptor TRPM8 attenuates autonomic and behavioral cold defenses and decreases deep body temperature. *The Journal of Neuroscience* 32 (2012) 2086-2099.
- [2] H.A. Braun, H. Bade, H. Hensel, Static and dynamic discharge patterns of bursting cold fibers related to hypothetical receptor mechanisms. *Pflügers Archiv – European Journal of Physiology* 386 (1980) 1-9.
- [3] C. Castillo, M. Norcini, J. Baquero-Buitrago, D. Levacic, R. Medina, J. V. Montoya-Gacharna, T. J. J. Blanck, M. Dubois, E. Recio-Pinto, The N-Methyl-D-Aspartate-evoked cytoplasmic calcium increase in adult rat dorsal root ganglion neuronal somata was potentiated by substance P pretreatment in a protein kinase C-dependent manner. *Neuroscience* 177 (2011) 308-320.
- [4] C.M. Krall, X. Yao, M.A. Hass, C. Feleder, A.A. Steiner, Food deprivation alters the thermoregulatory responses to lipopolysaccharide by enhancing cryogenic inflammatory signalling via prostaglandin D₂. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 298 (2010) R1512-R1521.
- [5] T. Kunikata, H. Yamane, E. Segi, T. Matsuoka, Y. Sugimoto, S. Tanaka, H. Tanaka, H. Nagai, A. Ichikawa, S. Narumiya, Suppression of allergic inflammation by the prostaglandin E receptor subtype EP3. *Nature Immunology* 6 (2005) 524-531.
- [6] R.M. Linte, C. Ciobanu, G. Reid, A. Babes, Desensitization of cold- and menthol-sensitive rat dorsal root ganglion neurons by inflammatory mediators. *Experimental Brain Research* 178 (2007) 89-98.
- [7] H. Liu, W. Li, M.E. Rose, J.L. Pascoe, T.M. Miller, M. Ahmad, S.M. Poloyak, R.W. Hickey, S.H. Graham, Prostaglandin D₂ toxicity in primary neurons is mediated through its bioactive cyclopentenone metabolites. *NeuroToxicology* 39 (2013) 35-44.
- [8] C. Munns, M. AlQatari, M. Koltzenburg, Many cold sensitive peripheral neurons of the mouse do not express TRPM8 or TRPA1. *Cell Calcium* 41 (2007) 331-342.

- [9] V.P. Navarro, M.M. Iyomasa, C.R. Leite-Panissi, M.C. Almeida, L.G. Branco, New role of the trigeminal nerve as a neuronal pathway signaling brain in acute periodontitis: participation of local prostaglandins. *Pflügers Archiv – European Journal of Physiology* 453 (2006) 73-82.
- [10] M. Okazawa, W. Inoue, A. Hori, H. Hosokawa, K. Matsumura, S. Kobayashi. Noxious heat receptors present in cold-sensory cells in rats. *Neuroscience Letters* 359 (2004) 33-36.
- [11] M. Okazawa, T. Terauchi, T. Shiraki, K. Matsumura, S. Kobayashi, *l*-Menthol-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase and impulses in cultured sensory neurons. *Neuroreport* 11 (2000) 2151-2155.
- [12] D. Ott, J. Murgott, S. Rafalzik, F. Wuchert, B. Schmalenbeck, J. Roth, R. Gerstberger, Neurons and glial cells of the rat *organum vasculosum laminae terminalis* directly respond to lipopolysaccharide and pyrogenic cytokines. *Brain Research* 1363 (2010) 93-106.
- [13] D. Ott, F. Wuchert, J. Murgott, C. Rummel, R. Gerstberger, J. Roth, The viral mimetic polyinosinic:polycytidylic acid (poly I:C) induces cellular responses in primary cultures from rat brain sites with an incomplete blood-brain barrier. *Neuroscience Letters* 530 (2012) 64-68.
- [14] A.M. Peier, A. Moorich, A.C. Hergarden, A.J. Reeve, D.A. Andersson, G.M. Story, T.J. Earley, I. Dragoni, P. McIntyre, S. Bevan, A. Patapoutian, A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* 108 (2002) 705-715.
- [15] G. Reid, A. Babes, F. Pluteanu, A cold- and menthol-activated current in rat dorsal root ganglion neurones: properties and role in cold transduction. *Journal of Physiology* 545.2 (2002) 595-614.
- [16] G. Ross, J. Roth, B. Störr, K. Voigt, E. Zeisberger, Afferent nerves are involved in the febrile response to injection of LPS into artificial subcutaneous chambers in guinea pigs, *Physiology & Behavior* 71 (2000) 305-13.
- [17] J. Roth, C.M. Blatteis, Mechanisms of fever production and lysis: Lessons from experimental LPS fever. *Comprehensive Physiology* 4 (2014) 1563-1604.
- [18] C. Rummel, S. W. Barth, T. Voss, S. Korte, R. Gerstberger, T. Hübschle, J. Roth, Localized vs. systemic inflammation in guinea pigs: a role for prostaglandins at distinct points of the fever induction pathways?. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 289 (2005) R340-R347.

- [19] K. Schäfer, H. A. Braun, C. Isenberg, Effect of menthol on cold receptor activity. Analysis of receptor processes. *Journal of General Physiology* 88 (1986) 757-76.
- [20] J. A. M. Smith, C. L. Davis, G. M. Burgess, Prostaglandin E₂- induced sensitization of bradykinin-evoked responses in rat dorsal root ganglion neurons is mediated by cAMP-dependent protein kinase A. *European Journal of Neuroscience* 12 (2000) 3250-3258.
- [21] D. M. Soares, D. Ott, M. C. Melo, G. E. Souza, J. Roth, Chemokine ligand (CCCL-3) promotes an integrated febrile response when injected within preoptic area (POA) of rats and induces calcium signaling in cells of POA microcultures but not TNF- α or IL-6 synthesis. *Brain, Behavior, and Immunity* 34 (2013) 120-9.
- [22] D.S. Straus, G. Pascual, M. Li, J.S. Welch, M. Ricote, C.H. Hsiang, L.L. Sengchanthalangsy, G. Gosh, C.K. Glass, 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF-kappaB signalling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97 (2000) 4844-4849.
- [23] F. Suto, H. Gotoh, Calcium signalling in cold cells studied in cultured dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience* 92 (1999) 1131-1135.
- [24] X. Zhang, S. Mak, L. Li, A. Parra, B. Denlinger, C. Delmonte, P.A. McNaughton, Direct inhibition of the cold-activated TRPM8 ion channel by G α , *Nature Cell Biology* 14 (2012) 850-858.

2. Publikation 2: Effects of prostaglandin E₂ on cells cultured from the rat *organum vasculosum laminae terminalis* and median preoptic nucleus

Veröffentlicht in: Neuroscience 313: 23-35 (2016)

**Effects of prostaglandin E₂ on cells cultured from the rat
organum vasculosum laminae terminalis and median preoptic
nucleus**

B. Simm, D. Ott, E. Pollatzek, J. Murgott, R. Gerstberger, C. Rummel and J. Roth

Institut für Veterinär-Physiologie und -Biochemie, Justus-Liebig-Universität Giessen,
Frankfurter Strasse 100, D-35392 Giessen, Germany

Corresponding author:

Joachim Roth

Institut für Veterinär-Physiologie und -Biochemie

Justus-Liebig-Universität Giessen

Frankfurter Strasse 100, D-35392 Giessen, Germany

Phone: +49-641 - 99 - 38850

Fax: +49-641 - 99 - 38159

E-mail: Joachim.Roth@vetmed.uni-giessen.de

Abbreviations

[Ca²⁺]_i, intracellular calcium concentration; COX-2, cyclooxygenase-2; CVOs, circumventricular organs; GABA, gamma amino butyric acid; ICC, immunocytochemistry; IL, interleukin; LPS, lipopolysaccharide; MnPO, median preoptic nucleus; MPO, medial preoptic area; mPGES-1, microsomal prostaglandin E synthase-1; OVLT, *organum vasculosum laminae terminalis*; PAMP, pathogen-associated molecular pattern; PBS, phosphate buffered saline; PGD₂, prostaglandin D₂; PGE₂, prostaglandin E₂; POA, preoptic area; SEM, standard error of the mean; TLR, toll-like receptor; TNF- α , tumor necrosis factor- α

ABSTRACT

The time course of the induction of enzymes responsible for the formation of prostaglandin E₂ (PGE₂) after an inflammatory insult, in relation to the concomitant febrile response, suggests that peripherally generated PGE₂ is involved in the induction of the early phase of fever, while centrally produced PGE₂ exerts pyrogenic capacities during the later stages of fever within the hypothalamic median preoptic nucleus (MnPO). The actions of peripherally derived PGE₂ on the brain might occur at the level of the *organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT), which lacks a tight blood-brain barrier and is implicated in fever, while the effects of PGE₂ within the MnPO might interfere with glutamatergic neurotransmission within a recently characterized central efferent pathway for the activation of cold-defence reactions. Using the fura-2 ratio imaging technique we, therefore, measured changes of the intracellular Ca²⁺ concentration in primary neuroglial microcultures of rat OVLT and MnPO stimulated with PGE₂ and / or glutamate. In cultures from the OVLT, as opposed to those derived from the MnPO, substantial numbers of neurons (8% of 385), astrocytes (19% of 645) and microglial cells (28% of 43) directly responded to PGE₂ with a transient increase of intracellular Ca²⁺. The most pronounced effect of PGE₂ on cells from MnPO microcultures was its modulatory influence on the strength of glutamate-induced Ca²⁺ signals. In 72 out of 512 neurons and in 105 out of 715 astrocytes PGE₂ significantly augmented glutamate-induced Ca²⁺ signals. About 30% of these neurons were GABAergic. These observations are in agreement with putative roles of peripheral PGE₂ as a directly acting circulating agent at the level of the OVLT, and of central MnPO-intrinsic PGE₂ as an enhancer of glutamatergic neurotransmission, which causes disinhibition of thermogenic heat production, a crucial component for the manifestation of fever. In microcultures from both brain sites investigated incubation with PGE₂ significantly reduced the lipopolysaccharide-induced release of cytokines (tumor necrosis factor- α and interleukin-6) into the supernatant. PGE₂, thus, seems to be involved in a negative feed-back loop to limit the strength of the brain inflammatory process and to play a dual role with pro- as well as anti-inflammatory properties.

Key words: prostaglandin E₂; glutamate; cytokines; calcium imaging; fever; inflammation; median preoptic nucleus; *organum vasculosum laminae terminalis*

INTRODUCTION

During infection and inflammation prostaglandin E₂ (PGE₂) is a pivotal terminal mediator of fever and some other brain-controlled symptoms of disease (Pecchi et al. 2009; Saper et al. 2012). Upon activation of innate immunity, PGE₂ is rapidly produced in the periphery, predominantly by hepatic and pulmonary macrophages (Li et al. 2006; Steiner et al. 2006) thereby causing an increase of PGE₂ in the blood. With regard to the manifestation of lipopolysaccharide (LPS) -induced fever, peripherally generated PGE₂ has been proposed to be the trigger for the rapidly developing first phase of the febrile response (Roth and Blatteis 2014, for review). Upon inflammatory stimulation a second source of PGE₂ is produced within the brain, predominantly by brain endothelial cells *via* a coupled induction of the enzymes cyclooxygenase-2 (COX-2) and microsomal PGE synthase-1 (mPGES-1) (Yamagata et al. 2001; Inoue et al. 2002; Ivanov and Romanovsky 2004; Wilhelms et al. 2014; Vasilache et al. 2015). The induced production of PGE₂ within the brain under conditions of systemic inflammation does not exclusively occur within brain sites, which are relevant for fever. For example, the cortex is a major brain area, where COX-2 derived production of PGE₂ is observed after inflammatory insults (Rummel 2015). In the cortex PGE₂ seems to contribute to changes of neurovascular coupling by inducing hyperemia (Lacroix et al. 2015). The functional consequences of the frequently observed inflammatory stimulation of PGE₂-formation in so many different brain areas (Rummel 2015) require further clarification. Our present study, however, has its focus on those brain sites, which are of special importance for the manifestation of fever.

Irrespective of its peripheral or central origin, PGE₂ exerts its pyrogenic action, at least for the later phases of fever, within a highly sensitive area of the brain. This area includes the *organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT) and surrounding or adjacent parts of the preoptic area (POA) (Williams et al. 1977; Matsumura et al. 1990; Scammell et al. 1996; Oka 2004; Lazarus 2006). Within this “pyrogenic zone” the OVLT can be directly accessed by circulating signal molecules due to the absence of a tight blood-brain barrier. Inflammatory molecules including cytokines or pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) are readily detected by cytokine receptors and Toll-like receptors (TLRs), which are strongly expressed in the OVLT (Roth et al. 2004). In cells cultured from the rat OVLT direct cellular responses can be recorded upon exposure to cytokines or PAMPs

(Ott et al. 2010; Bastos-Pereira et al. 2014). Therefore, one goal of this study was to investigate whether primary neuroglial cell cultures from the OVLT are also responsive to PGE₂, which might act as a circulating humoral messenger at this brain site.

Within the preoptic area (POA), two substructures gained special attention regarding their responsiveness to PGE₂ and their roles in activation of fever-inducing efferent pathways, i.e. the median preoptic nucleus (MnPO) and the medial preoptic area (MPO) (Nakamura 2011; Morrison and Nakamura 2011). Within these closely neighboring structures deletion of the PGE₂-receptor EP₃ resulted in a blunted febrile response to systemic injection of LPS or central injections of PGE₂ (Lazarus et al. 2007). It is, thus, likely that PGE₂ triggers the manifestation of fever at this location. The activation of cold defense responses by MnPO neurons depends on glutamatergic inputs to these neurons (Nakamura and Morrison 2008). It has been suggested that glutamate receptor expressing MnPO neurons responding to cutaneous cold signals subsequently employ gamma amino butyric acid (GABA) to transmit an inhibitory input to MPO neurons, which in turn exert a tonic inhibitory input to caudal brain sites involved in activation of thermogenesis (Nakamura 2011). A stimulation of the MnPO neurons with glutamate would, thus, result in a disinhibition of thermogenesis. It is, therefore, tempting to speculate that PGE₂ might modulate the responses of MnPO neurons to glutamate, since fever and cold defense are triggered by the same physiological reactions (Roth and Blatteis 2014). Testing this hypothesis was the second goal of our study.

Systemic infections or inflammation induce cascades of inflammatory mediators (i.e. cytokines and others) in the periphery and within the brain. The role of PGE₂ within these cascades is not exclusively a pro-inflammatory one. There is some evidence that PGE₂ is part of a feedback loop that helps to limit the pro-inflammatory cascade in strength and duration in the periphery and in the brain (Roth et al. 2002; Zhang and Rivest 2001). We previously reported that cultures from the OVLT and MnPO show pronounced formation of cytokines upon stimulation with LPS (Ott et al. 2010; Soares et al. 2013). As the third goal of this study we, therefore, tested whether incubation of these cultures with PGE₂ has impact on the LPS-induced production of selected cytokines by cells of both brain sites.

We show that a substantial number of cells cultured from the OVLT, predominantly astrocytes and microglial cells but also neurons, directly respond to PGE₂ with an increase

of intracellular Ca^{2+} -concentration. Such an effect is hardly observed in MnPO cultures; but there are populations of MnPO neurons and astrocytes, in which the strength of glutamate-induced Ca^{2+} -signals is modulated by PGE_2 . We finally demonstrate anti-inflammatory capacities of PGE_2 , since the LPS-induced release of tumor necrosis factor- α (TNF- α) into the supernatants of OVLT- and MnPO cultures is attenuated by incubation with PGE_2 .

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals

Wistar rat pups of both sexes obtained from an in-house breeding colony were used for all experiments, with parental animals originating from Charles River WIGA (Sulzfeld, Germany). Animal care, breeding, and experimental procedures have been conducted according to the guidelines approved by the Hessian Ethical Committee (reference number GI 18/2 Nr. A33/2012 527_AZ). Adult rats had free access to drinking water and standard laboratory chow; the pups were reared by their mothers in large M4-size cages. Room temperature was set to $24 \pm 1^\circ\text{C}$ and relative humidity at 50%, and artificial lights were on from 7:00 AM to 7:00 PM.

Isolation and cultivation of OVLT and MnPO primary cell cultures

Primary microcultures of the rat OVLT and MnPO were established from topographically excised brain tissue of 4–6 days old Wistar rat pups. For this purpose three animals per preparation were quickly decapitated with sharp scissors and the heads were immersed in cold 70% ethanol. Each brain was immediately removed from the skull under aseptic conditions, fixed onto a Teflon®-block with Histoacryl® tissue glue (Braun AG, Melsungen, Germany), and rapidly transferred to a chamber containing ice-cold oxygenated Gey's Balanced Salt Solution (GBSS; Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany) containing 0.5% D-glucose (Sigma Aldrich Chemie GmbH). The chamber was fixed to a vibratome (752 M Vibroslice; WPI, Berlin, Germany) and serial coronal brain slices (400 μm) were cut at the level of the anterior hypothalamus. Using the anterior commissure and optic chiasm as main neuroanatomical landmarks (Paxinos

and Watson, 2005), the sections containing the OVLT and MnPO were selected. The OVLT and MnPO regions were dissected under stereomicroscopic control (SMZ-U; Nikon, Düsseldorf, Germany) from the surrounding anterior third ventricular region using fine eye scissors. The isolated OVLT and MnPO tissue fragments were transferred into Petri dishes with oxygenated Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) without Ca^{2+} and Mg^{2+} (Biochrom GmbH, Berlin, Germany) supplemented with 20 mM HEPES (Sigma Aldrich Chemie GmbH), pH 7.4. The supernatant was removed, and the fragments were enzymatically digested in dispase I (1.2 U/ml; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) dissolved in oxygenated HBSS for 45 min at 37°C. After enzymatic treatment, the fragments of both brain regions were washed in 1 mM EDTA (Sigma Aldrich Chemie GmbH) in HBSS to inactivate the enzyme. Subsequently, EDTA was removed by washing in complete medium consisting of Neurobasal A supplemented with 2% B27, penicillin (100 U/ml) / streptomycin (0.1 mg/ml) and 2 mM L-glutamine (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany). Finally, the OVLT and MnPO fragments were dissociated by repeated trituration with a 1 ml Eppendorf pipette and resuspended in complete medium with a cell number of 75.000 cells/ml and plated onto poly-L-lysine (0.1 mg/ml; Biochrom GmbH) coated and gridded glass coverslips (Cell-VU; Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Germany) forming the bottom of a reusable Flexiperm-micro-12 well (6 mm diameter; Greiner Bio-One GmbH, Solingen, Germany). Cells were cultured in a humidified atmosphere of 5% CO_2 and 95% air at 37°C and the medium was exchanged the next day to remove cellular debris and, thereafter, every second day during the culture period. The cells were used for intracellular calcium measurements and subsequent immunocytochemical characterization, and their cell supernatants were used to measure bioactive cytokines. Measurements of intracellular calcium and the stimulations were performed after 4-6 days of cell cultivation (for further details see: Ott et al. 2012; Soares et al. 2013; Bastos-Pereira et al. 2014).

Measurement of intracellular calcium in single fura-2-loaded MnPO and OVLT cells

After cultivation, MnPO and OVLT cells were loaded with 2 μM fura-2-AM (Life Technologies GmbH) in complete medium for 45 min in a humidified atmosphere of 5% CO_2 and 95% air at 37°C. For intracellular Ca^{2+} -measurements, the coverslips were

placed under an inverted microscope (IMT-2; Olympus GmbH, Hamburg, Germany) in a specially constructed Teflon® culture chamber and superfused with Ca^{2+} -imaging buffer consisting of 5 mM HEPES, 130 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.0 mM MgCl_2 , 1.25 mM CaCl_2 and 10 mM D-glucose (Sigma-Aldrich Chemie GmbH), pH 7.4, with a flow rate of two ml per minute. Fluorescence measurements were performed using a filterwheel-based excitation system and analyzed with MetaFluor 7.7.8.0 software (Visitron GmbH, Puchheim, Germany). After defining regions of interest for single cells, the time course of emitted fluorescence (>515 nm) after alternating excitations at 340 and 380 nm, respectively, was recorded using a Spot Pursuit digital CCD-camera (Model 23.0, Visitron GmbH). The 340 / 380 nm ratios proportional to $[\text{Ca}^{2+}]_i$ were computed and analyzed. Measurements of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ were performed at a chamber temperature of 22-25°C. Several experiments showed that cellular responses to glutamate and / or PGE_2 were very similar at a chamber temperature of 37°C (see: supplementary Fig. 2), but the baseline was more stable at the lower chamber temperature. All substances used for stimulation were stored as stock solutions of prostaglandin E_2 (PGE_2 , 1 mM), prostaglandin D_2 (PGD_2 , 1 mM) (Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Germany) and glutamate (GLU, 0.1 M) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) in Ca^{2+} -imaging buffer at -20°C. They were diluted in Ca^{2+} -imaging buffer to their working concentrations of 10 μM PGE_2 , 10 μM PGD_2 and 10 μM glutamate just prior to experimentation. The dose was chosen according to preliminary recordings from pilot studies, in which several doses were tested. For PGE_2 , the K_d values of the EP_{1-4} receptors are in the range 5-40 nM (Ushikubi et al. 1995). Our working solution contained substantially higher concentrations of PGE_2 , but with regard to the short half-life time of this substance and the mixture with the culture medium in the chamber it is difficult to assess the concentration of PGE_2 , to which the cells were exposed. A working solution of 1 μM PGE_2 was also capable to evoke similar responses. Substances were applied to the recording chamber *via* superfusion at a rate of 2 ml per minute for 180 seconds (see also: Ott et al. 2015). At the end of the experiments, cells were exposed to Ca^{2+} -imaging buffer consisting of 1.5 mM HEPES, 43 mM NaCl, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl_2 , 1 mM CaCl_2 and 10 mM D-glucose (Sigma Aldrich Chemie GmbH). The treatment with the high K^+ -concentration and the resulting cellular responses served as a vitality test for neurons and to some degree for astrocytes.

Immunocytochemical characterization of MnPO and OVLT cell cultures

Each single cell analyzed with calcium imaging was subsequently identified according to its exact position on the Cell-VU gridded glass coverslips (see: Ott et al. 2010). Phenotypic identification of OVLT and MnPO cells was carried out by immunolabeling with polyclonal antisera or monoclonal antibodies directed against cell-specific marker proteins such as glial fibrillary acidic protein for astrocytes (rabbit anti-GFAP; DAKO GmbH, Hamburg, Germany), microtubule associated protein 2 for neurons (mouse AP-20 anti MAP2a+b; Sigma Aldrich Chemie GmbH) and ED1 for microglial cells (mouse anti CD68; AbD Serotec, Puchheim, Germany). Examples are shown in Figure 1. Due to the specific culture medium and conditions, endothelial cells were not present (negative immune-labeling for van Willebrand factor; Ott et al. 2010).

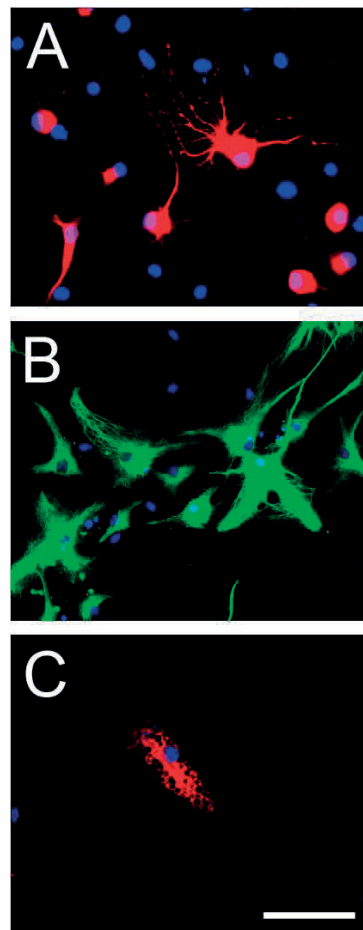


Figure 1: Cellular phenotypes in MnPO and OVLT primary microcultures

Examples for a phenotypic characterization of the cell phenotypes investigated in this study. Immuno-labeling was performed with primary antibodies directed against cell-specific marker proteins [MAP2a+b for neurons (A); GFAP for astrocytes (B); ED-1 for microglial cells]. Secondary antibodies were coupled to flourophores. Scale bar represents 50µm.

Additionally, some cultures were immunocytochemically labeled with a polyclonal gamma amino butyric acid antiserum (rabbit anti-GABA; Sigma Aldrich Chemie GmbH). This antiserum has successfully been used for staining of GABAergic neurons in culture (Maric et al. 2001) and brain sections (Gonchar et al. 2008). Therefore, subsequent to Ca^{2+} -measurements, the cells were fixed with 4% freshly prepared paraformaldehyde in PBS (Sigma Aldrich Chemie GmbH), pH 7.4, for 15 min at RT. The fixed cells were rinsed three times in PBS, followed by a 60-min incubation in blocking buffer containing 10% fetal calf serum (FCS; Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Germany) diluted in PBS-T containing 0.05% Triton X-100 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH). The incubation with the primary antibodies / antisera diluted in blocking buffer (anti-GFAP 1:1000, anti-MAP2a+b 1:1000, anti-ED1 1:1000, anti-GABA 1:2000) was carried out for 48 h at 4°C in a humidified chamber. Unbound antibodies were removed by washing three times with PBS-T. Thereafter, cells were incubated with fluorophore-coupled secondary antisera Alexa-488 donkey anti-rabbit IgG (H+L), Alexa-488 donkey anti- mouse IgG (H+L) (Life Technologies GmbH), Cy3 goat anti-mouse IgG (H+L) and Cy3 donkey anti-rabbit IgG (H+L) (Dianova GmbH, Hamburg, Germany) at 1:500 or 1:1000 dilutions in blocking buffer for 2 h at RT. After washing three times in PBS-T for 5 min each, the coverslips were embedded using a glycerol / PBS solution (Citifluor Ltd., London, UK). Cellular nuclei were labeled by incubation with 2-(4-amidinophenyl)-1H-indole-6-carboxyamidine (DAPI; Mobitec GmbH, Goettingen, Germany) for eight minutes. The cells were examined and photographed with an Olympus BX50 epifluorescence microscope (Olympus GmbH) equipped with the appropriate filters.

Measurements of TNF- α and IL-6 in supernatants of MnPO and OVLT microcultures

After four days of cultivation the MnPO and OVLT cells were incubated with lipopolysaccharide (LPS; 10 µg/ml, Sigma Aldrich Chemie GmbH), PGE₂ (10 µM), PGD₂ (10 µM), combinations of LPS together with PGE₂, PGD₂ or solvent for 120 or 360 min in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air at 37°C. The LPS stock solution was dissolved in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS; Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Germany), pH 7.4, at concentrations of 1.0 mg/ml and was stored at -20°C. The working solutions of PGE₂ and PGD₂ were prepared using frozen stock

solutions. All substances were dissolved in complete medium to their final concentrations. After incubation, the supernatants were removed from the cells, transferred and stored at -20°C for later measurement of cytokines. Measurement of TNF- α was performed by a bioassay based on the cytotoxic effect of TNF- α on the mouse fibrosarcoma cell line WEHI 164 subclone 13. The assay was carried out in sterile, 96-well microtiter plates. Serial dilutions of biological samples or different concentrations of a murine TNF- α standard (code 88/532; National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), South Mimms, UK) were incubated for 24 h in wells that had been seeded with 50,000 actinomycin-D-treated WEHI cells. The number of surviving cells after 24 h was measured by use of the dimethylthiazol-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) colorimetric assay as previously described (Welsch et al. 2012; Damm et al. 2014). Supernatants of MnPO and OVLT microcultures were pre-diluted so that serial dilutions of samples and standard dilution curves were parallel. The detection limit of the assay, after considering the dilution of samples for the assays, proved to be 6.0 pg/ml TNF- α . Determination of IL-6 was performed by a bioassay based on a dose-dependent growth stimulation of IL-6 on the B9 hybridoma cell line. The assay was performed in sterile, 96-well microtiter plates. In each well, 5,000 B9 cells were incubated for 72 h with serial dilutions of biological samples or with different concentrations of human IL-6 standard (code 89/548; NIBSC). The number of cells in each well was measured by use of the MTT assay (see above). The detection limit of the assay, after considering the dilution of samples for the assays, proved to be 3.0 international units (IU) IL-6 /ml.

Evaluation and statistics

The numbers of glutamate and / or PGE₂- responsive cells of a given cellular phenotype under determined experimental conditions were expressed as percentage (%) of all cells of this phenotype investigated. Stimulus-induced, transient increases of [Ca²⁺]_i were expressed as the difference between resting [Ca²⁺]_i measured prior to the respective stimulation and the stimulus-induced [Ca²⁺]_i peak (Δ ratio [340/380 nm]). A difference in Δ ratio [340/380 nm] of more than 0.05 was considered to be a stimulus-induced Ca²⁺-signal, which can be regarded as a strict exclusion criterion. The Δ ratio values are presented as means \pm standard error of the mean (SEM) and compared by an analysis of variance (ANOVA) followed by the Newman-Keuls multiple comparisons test. Levels of

bioactive TNF- α and IL-6 are also shown as means \pm SEM and compared by ANOVA and Newman-Keuls test. The calculations were carried out using the software package GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., LaJolla, CA, USA).

RESULTS

PGE₂ induces calcium signals in cells of OVLT microcultures with preponderance of glial cells

In the first experiment we tested and evaluated the responsiveness of OVLT and MnPO microcultures to superfusions with PGE₂-containing Ca²⁺ imaging buffer. An example for a PGE₂-responsive OVLT-neuron is shown in Figure 2A. This neuron responded to PGE₂ with a transient increase of [Ca²⁺]_i. Shape and duration of these Ca²⁺-signals resembled those, which we recently described for PGE₂-responsive neurons of dorsal root ganglia (Ott et al. 2015).

Quantitative analysis of these experiments revealed that cultures from the OVLT contained much more cells responding to PGE₂ as compared to those from the MnPO (Fig. 2B). Just 4% of all MnPO neurons investigated, about 2% of all astrocytes and not a single microglial cell responded to PGE₂ with a transient increase of [Ca²⁺]_i. In cultures from the OVLT 8% of all neurons, 19% of all astrocytes and 28% of all microglial cells responded with Ca²⁺-transients upon stimulation with PGE₂. Regarding the direct responsiveness to PGE₂, the OVLT, thus, seems to be a more sensitive brain site as compared to the MnPO.

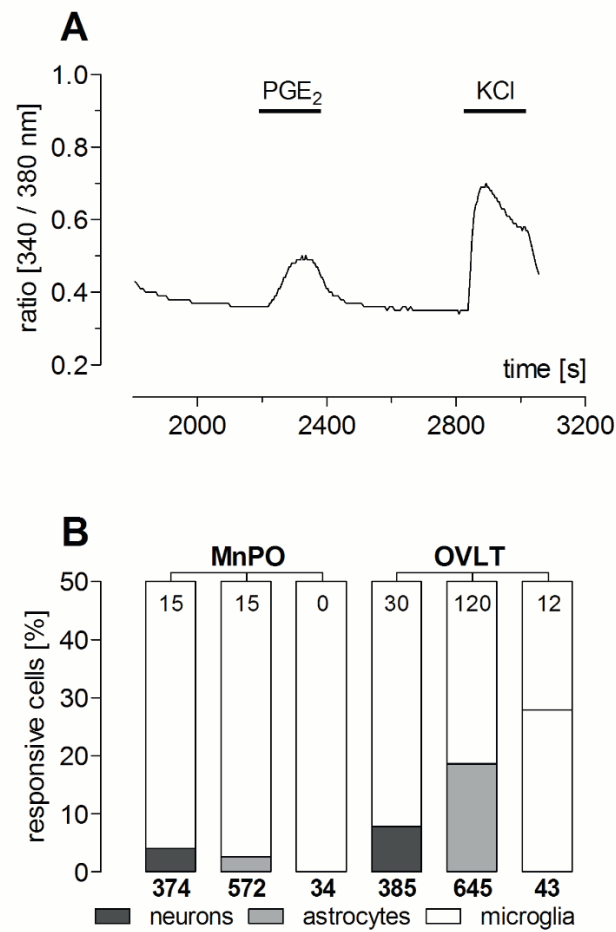


Figure 2: Populations of neurons and astrocytes from MnPO and OVLT primary cultures directly respond to PGE₂ with an increase of [Ca²⁺]_i

A: Example of an intracellular calcium tracing recorded from a neuron of a primary OVLT microculture illustrating the responsiveness to PGE₂ (10 μM). Superfusion with buffer containing a high concentration of KCl (50 mM) served as vitality test for neurons at the end of the experiment.

B: Percentages and numbers of neurons, astrocytes, and microglial cells from MnPO or OVLT primary cultures, which directly responded with an elevation of the intracellular Ca²⁺-concentration ([Ca²⁺]_i) to PGE₂ exposure.

PGE₂ modulates the strength of glutamate-induced Ca²⁺-signals in populations of neurons and astrocytes of MnPO primary cultures

Regarding the proposed effects of PGE₂ within the thermoafferent pathways and the central circuitries involved in the manifestation of fever it seemed to be of special importance to test the effect of PGE₂ on glutamate-induced Ca²⁺-responses of MnPO-neurons (see: Introduction). MnPO cultures were first superfused with Ca²⁺-imaging buffer containing glutamate (10 µM), thereafter with a mixture of glutamate and PGE₂ (both 10 µM) and finally once more with glutamate at equimolar concentration (10 µM) alone. Examples of such experiments are shown in Fig. 3 (A, B).

In 32.6 % of all MnPO neurons (N = 512) and in 24.6 % of all MnPO astrocytes (N = 716) investigated, co-administration of PGE₂ modulated the normal glutamate-responses (Fig. 3C); either the amplitude of the intracellular calcium signal was enhanced (Fig. 3A) or decreased (Fig. 3B). Such an effect was not observed in microglial cells. To quantify these observations we calculated the mean Δ ratio [340/380 nm] values (Fig. 4). In those neurons (n = 72) and astrocytes (n = 105), in which co-administration of PGE₂ caused enhanced [Ca²⁺]_i, this increase was significant when compared to the first and the last superfusion stimulation with glutamate alone (Fig. 4). In contrast, the decrease of [Ca²⁺]_i in those neurons (n = 95), in which co-administration of PGE₂ reduced the strength of Ca²⁺-signals, was not significant when compared to both exposures to glutamate without PGE₂ (Fig. 4). However, in astrocytes the decrease of glutamate-induced [Ca²⁺]_i in cells exposed to glutamate together with PGE₂ reached a level of statistical significance when compared to the first stimulation with glutamate alone.

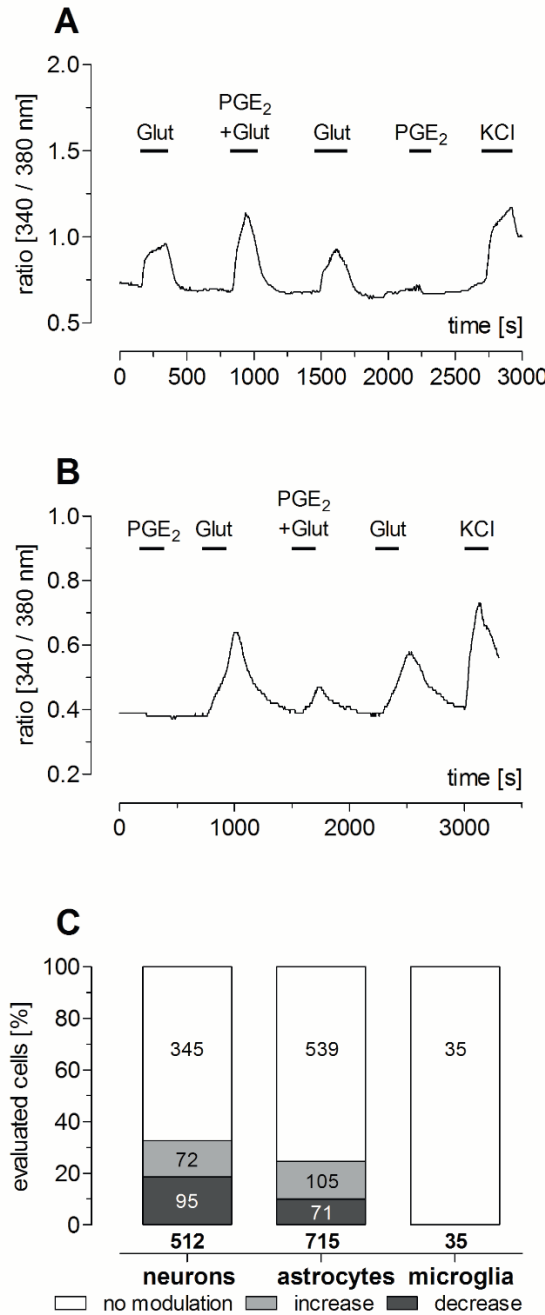


Figure 3: Modulation of glutamate-induced Ca^{2+} -signals by PGE_2 in populations of neurons and astrocytes from MnPO primary cultures

A, B: Examples of intracellular calcium tracings recorded from two neurons of the MnPO, in which glutamate (Glut; $10\mu\text{M}$) -induced increases of intracellular Ca^{2+} -concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) were modulated by co-administration of PGE_2 ($10\mu\text{M}$), either enhanced (A) or attenuated (B). Cells were first superfused with glutamate alone, then with a mixture of glutamate and PGE_2 , finally once more with equimolar glutamate alone. Superfusion with buffer containing a high concentration of KCl (50 mM) served as vitality test for neurons at the end of the experiment.

C: Percentages and numbers of neurons, astrocytes, and microglial cells from MnPO primary cultures, for which a modulation of the glutamate-induced elevation of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was modulated by PGE_2 .

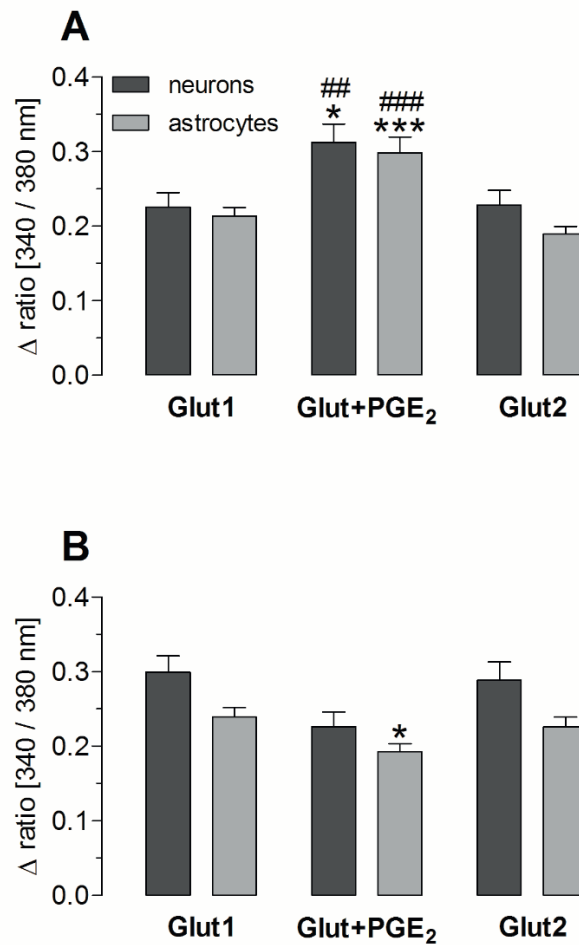


Figure 4: Glutamate-induced Ca^{2+} -signals are enhanced by PGE_2 in a population of neurons from MnPO primary cultures

Δ ratio [340/380 nm] fluorescence values as measure of intracellular calcium concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Columns represent means \pm SEM of those cells, in which co-administration of PGE_2 enhanced glutamate (Glut; 10 μM) -induced increase of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (neurons: $n = 72$; astrocytes: $n = 105$). Cultures were first stimulated with glutamate alone (Glut1), then with glutamate together with PGE_2 (Glut + PGE_2), and finally again with glutamate alone (Glut 2).

(*: $p < 0.05$; ***: $p < 0.001$ versus Glut1; ##: $p < 0.01$; ####: $p < 0.001$ versus Glut2).

We repeated this experiment at an ambient temperature of 37°C in a smaller population of cells and obtained very similar results compared to those shown in Fig. 4 (not shown).

In vivo studies suggested that at least a part of those MnPO neurons, which are activated by glutamatergic inputs and express PGE_2 -receptors, are GABAergic in nature (Nakamura et al. 2002). We, therefore, tested whether at least a subpopulation of those neurons from MnPO primary cultures, which showed enhanced glutamate-evoked Ca^{2+} -signals by co-exposure to PGE_2 , were also GABAergic. For this purpose, an established

antiserum directed against GABA was employed in combination with antisera against cell type specific marker proteins for immunocytochemical staining. Examples are shown in Figure 5.

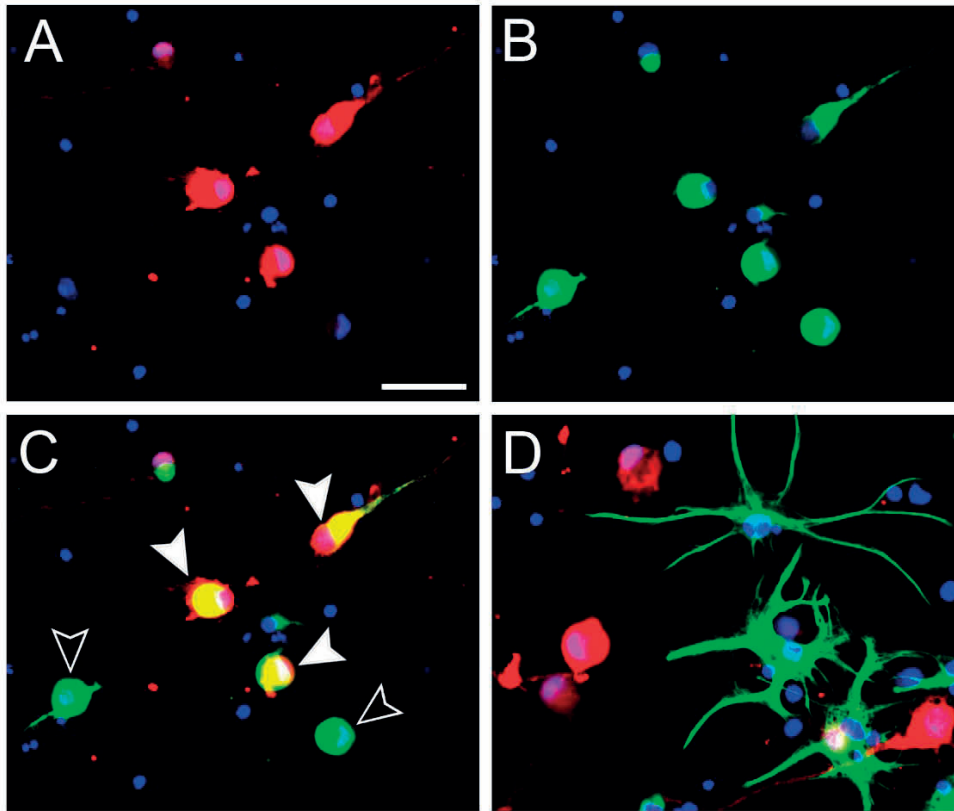


Figure 5: GABAergic neurons are present in MnPO primary cultures

A - C: Triple labeling for GABA (red, A), MAP2a+b (green, B) and cellular nuclei (DAPI stain, blue) allowed to determine co-localization of GABA with the neuronal marker MAP2a+b (yellow in C). Some (white arrowheads) but not all (open arrowheads) MnPO neurons were GABA-positive. Scale bar = 25µm

D: Triple labeling for GABA (red), GFAP (green) and cellular nuclei (blue) allowed to determine that GABA-like immunoreactivity did not occur in astrocytes.

Cell counting revealed that 28% of all neurons of MnPO primary microcultures were immunocytochemically labeled by the antiserum against GABA. Examples of cells that were labeled by an antibody against the neuronal cell marker MAP2a+b and GABA are illustrated in Fig. 5 A-C. In contrast, astrocytes (Fig. 5D) as well as microglial cells were not stained by the GABA antibodies. We repeated the experiments shown in figures 3 and 4 and co-labeled the superfusion stimulated cultures thereafter with antibodies /-sera against GABA and MAP2a+b. We identified those neurons that showed an increase in glutamate-induced $[Ca^{2+}]_i$ by co-administration of PGE_2 (Fig. 3A, Fig. 4A) and calculated that 29.5% of these neurons were GABA-positive.

PGE₂ reduces the release of cytokines by LPS-stimulated OVLT and MnPO primary cultures into the supernatants

We finally tested the effects of PGE₂ on the LPS-induced release of TNF- α and IL-6 into the supernatants of MnPO and OVLT primary cultures. For comparative reasons we also tested the effects of PGD₂ in this experimental approach, which is known to exert antipyretic and anti-inflammatory capacities. The results of these measurements are shown in Fig. 6.

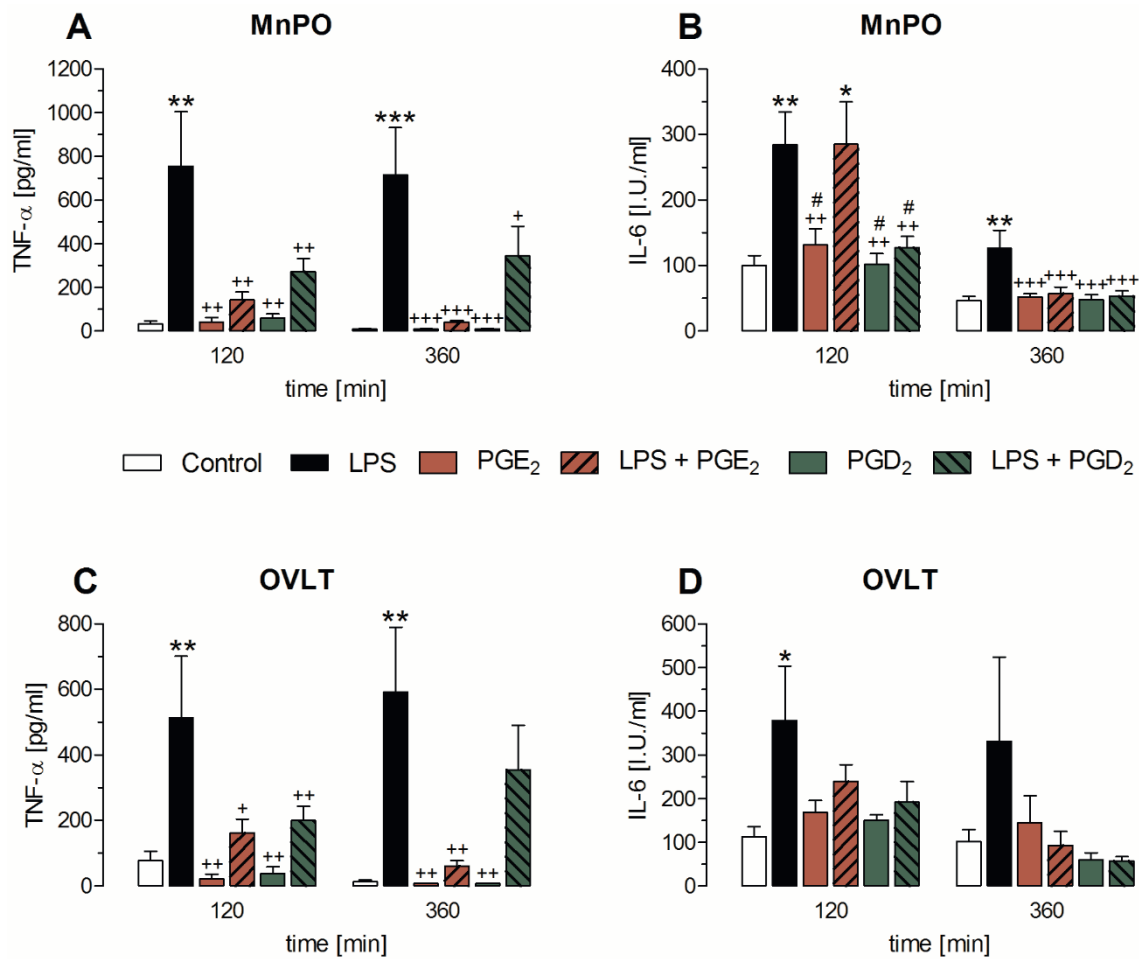


Figure 6: TNF- α and IL-6 concentrations in supernatants of MnPO and OVLT primary cultures

After 4-6 days of cultivation on CELLocate glass coverslips, MnPO and OVLT primary cultures were incubated for 120 or 300 min with fresh medium containing PBS (control), LPS (10 μ g/ml), PGE₂ (10 μ M), PGD₂ (10 μ M), LPS + PGE₂, or LPS + PGD₂. Columns represent means with SEM ($n = 6-8$ samples per column). [*: significant difference versus control; +: significant difference versus LPS; #: significant difference versus LPS + PGE₂; one symbol: $p < 0.05$; two symbols: $p < 0.01$; three symbols: $p < 0.001$].

Incubation of MnPO and OVLT primary cultures with LPS stimulated release of bioactive TNF- α (Fig. 6A, C) and IL-6 (Fig. 6B, D) into the supernatant of both cultures. Incubation of cells with both, PGE₂ or PGD₂, together with LPS reduced the stimulated release of TNF- α into the supernatant of MnPO and OVLT cultures (Fig. 6A, C). This effect was less pronounced for IL-6 or even absent (Fig. 6B, D). The suppressive effect of PGE₂ on LPS-induced formation of TNF- α was even stronger when compared to the effect of PGD₂. These data support evidence for a role of PGE₂ to limit and regulate stimulus-induced formation of cytokines in brain tissue.

DISCUSSION

The main results of our study can be summarized as follows: In cells cultured from the rat OVLT, substantial numbers of neurons, astrocytes, and microglial cells responded to PGE₂ with an increase of $[Ca^{2+}]_i$. In cells cultured from the MnPO, substantial numbers of neurons and astrocytes showed enhanced glutamate-induced Ca^{2+} -signals by co-administration of PGE₂, although these cells did not show an increase of $[Ca^{2+}]_i$ when they were exposed to PGE₂ alone. In another population of astrocytes glutamate-induced Ca^{2+} -signals were attenuated by PGE₂. Incubation of cells cultured from OVLT and MnPO with PGE₂ resulted in attenuated levels of TNF- α in the supernatants after stimulation with LPS for 120 or 360 min. These observations are discussed in the light of the proposed or established functions of PGE₂ in those brain areas.

PGE₂ evoked Ca^{2+} signals in OVLT and MnPO primary cultures

We observed that almost 10% of all tested neurons, and 20-30% of astrocytes and microglial cells from OVLT primary cultures responded to PGE₂ with measurable increases of $[Ca^{2+}]_i$. In contrast, the number of PGE₂-responsive cells of all investigated phenotypes was rather low in MnPO primary cultures. Matsumura et al. (1990) reported a very high binding density for radioactively labeled PGE₂ within the MnPO, while binding of labeled PGE₂ within the OVLT proved to be less pronounced. Still, PGE₂ receptors are present in both brain sites, but the distribution of the receptor-subtypes is distinct. Four subtypes of PGE₂-receptors (EP₁-EP₄) have been described so far, which

are all G-protein coupled receptors employing distinct signal transduction pathways (Oka 2004, for review). Using *in situ* hybridization with radioactive antisense probes complementary to the rat EP₁₋₄ receptors, mapping of receptors for PGE₂ was performed for the OVLT and MnPO (Oka et al. 2000). Interestingly, there were striking differences between both brain sites with regard to the expression of PGE₂-receptors. In the OVLT, on the one hand, there was just weak expression of EP₃, but stronger expression of EP₁ and EP₄. In the MnPO, on the other hand, there was pronounced expression of EP₃ and EP₄ (Oka et al. 2000; Vasilache et al. 2007). Activation of the EP₁ receptor employs elevation of intracellular Ca²⁺ as intracellular second messenger, while binding of PGE₂ to EP₄ stimulates adenylate cyclase. EP₃ receptor signaling is predominantly involved in inhibition of adenylate cyclase *via* inhibitory G-protein (G_i) activation (Hatae et al. 2002; Oka 2004, for review). An increase of [Ca²⁺]_i can principally occur in response to activation of each of the three PGE₂-receptors, which are present in OVLT and MnPO, as the subunit G₁₂ from G_i linked to EP₃ can cause Ca²⁺-mobilization (Hatae et al. 2002). Our observation that more cells cultured from the OVLT (compared to the MnPO) showed PGE₂-induced Ca²⁺-signals and that EP₃ is weakly expressed in the OVLT (as opposed to the MnPO) suggest that EP₁ and / or EP₄ receptors are more likely involved in the generation of the observed PGE₂-evoked Ca²⁺-signals. The functional relevance of these Ca²⁺-signals is not clear. However, the lack of prominent EP₃ expression in the OVLT questions the proposed critical role of this brain site in the manifestation of fever (Blatteis 1992; Roth et al. 2004) since EP₃-receptor deficient mice fail to develop fever in response to LPS (Ushikubi et al. 1998). A later study on EP₁-receptor deficient mice, however, provided evidence that also activation of EP₁ contributes to the production of fever in response to LPS, especially during the early phase of the febrile response (Oka et al. 2003). The OVLT is a brain site with an incomplete blood-brain barrier and, therefore, directly exposed to circulating PGE₂. Since peripherally derived PGE₂ is thought to be responsible for the early initiation of LPS-fever (Blatteis 2006; Li et al. 2006; Steiner et al. 2006), it is tempting to speculate that the observed Ca²⁺-signals in cells cultured from the OVLT (Fig. 1) are induced *via* activation of the EP₁ receptor and, perhaps, involved in the initiation of fever. It should, however, be considered that there might be differences regarding the responsiveness of OVLT-cells cultured from neonatal rat brains and brains of adult animals, which could have been repeatedly exposed to inflammatory signal molecules including PGE₂ during their lifetime. Phenomena such as receptor-upregulation or desensitization might occur, depending on the given internal

milieu of the animal. Effects like this can readily be investigated in the primary cultures used for our experiments (Wuchert et al. 2008). It will be of interest to investigate in further studies, how a pre-exposure with PGE₂ might alter the responsiveness of OVLT-cells to an acute stimulation with this substance.

It was conspicuous that glial cells, astrocytes and microglia of OVLT cultures were more responsive to PGE₂ than neurons, with regard to absolute numbers and percentages of responding cells. Astrocytes are secretory cells, which participate in rapid brain communication by releasing glutamate (Cali et al. 2014). Interestingly, it could be demonstrated in a recent study that administration of PGE₂ induces Ca²⁺-dependent glutamate exocytosis in astrocytes (Cali et al. 2014). Provided that a mechanism like this would operate in the OVLT, locally released glutamate or another transmitter might activate neuronal connections from the OVLT to the MnPO under the influence of PGE₂ (i.e. under conditions of systemic inflammation). Whether or not such an astrocyte-mediated neuronal activation contributes to fever or modifications of other vital homeostatic functions (McKinley et al. 2015), is speculative at this stage.

Modulation of glutamate-induced Ca²⁺-signals in cells of MnPO primary cultures

Based on a number of sophisticated *in vivo* studies, a model of the thermoregulatory system was elaborated, which incorporates the effects of PGE₂ within the MnPO to produce fever (Nakamura & Morrison 2008; Morrison & Nakamura 2011; Nakamura 2011). According to this model activation of EP₃-receptors on MnPO neurons is regarded as a critical step for the manifestation of a febrile response (Lazarus et al. 2007). These neurons are supposed to be GABAergic and to be excited by glutamate (Nakamura et al. 2002). This model further suggests that preoptic neurons provide a tonic descending inhibition to caudal brain structures, which drive thermogenic responses. Stronger activation of the GABAergic MnPO neurons by afferent cold signals or by PGE₂ (fever) would then result in disinhibition of thermogenesis (Nakamura et al. 2005; Nakamura 2011). Our Ca²⁺-measurements in cells cultured from the MnPO and stimulated with glutamate and PGE₂ can serve as support for this concept of thermoregulatory circuitries. We were able to identify populations of MnPO-neurons and -astrocytes, which showed enhanced glutamate-evoked Ca²⁺-signals by co-administration of PGE₂ (Figs. 2 and 3). Preliminary data obtained from experiments with tissue from broader areas of the POA

(Soares et al. 2013) indicate that the MnPO is not exclusive site within this area, where such responses occur. Our observations are in line with an electrophysiological investigation on dissociated preoptic neurons (Katafuchi et al. 2005). Perfusions of these preparations with PGE₂ did *per se* not produce apparent ionic currents through the membrane, but selectively potentiated the glutamate-induced Ca²⁺-dependent currents in these neurons. This result was interpreted as a modulatory effect of PGE₂ on Ca²⁺-dependent ionic currents (Katafuchi et al. 2005). Similar modulatory effects of other neuroactive substances on glutamate-evoked Ca²⁺-signals were reported for neurons cultured from the rat hypothalamus (Obrietan et al. 1995; Kopp et al. 2001). Thus, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) amplified glutamate-induced Ca²⁺-signals by interacting with ionotropic glutamate receptors of the AMPA / kainate type. On the other hand, PACAP reduced the strength of glutamate-induced Ca²⁺-signals by acting on metabotropic glutamate receptors (Kopp et al. 2001). Since we observed enhancement as well as attenuation of glutamate-evoked Ca²⁺-signals by PGE₂ in our experiments (Fig. 3), it will be of interest to determine in future studies, whether both effects are associated with distinct glutamate-receptors. Another possibility to explain the observation that PGE₂ can evoke enhancement as well as attenuation of glutamate-induced Ca²⁺-signals in cells from MnPO-cultures could relate to distinct PGE₂-receptors. As already mentioned above, EP₃ is the predominant PGE₂-receptor within the MnPO, which is critical for the manifestation of fever (Lazarus et al. 2007). However, there are several splice variants of the EP₃ receptor detectable within the MnPO (Vasilache et al. 2007), which are termed EP_{3a}, EP_{3b}, EP_{3c} (Schmid et al. 1995), EP_{3□}, EP_{3□}, EP_{3□} (Hatae et al. 2002), or EP_{3I}, EP_{3II}, EP_{3III} (Kotani et al. 1995). In the preoptic area of the mouse, which includes the MnPO, there is a predominant expression of the splice variant EP_{3a} and also an expression of EP_{3c}, which accounts for about 15% of the total EP₃-receptor expression. EP_{3b}, on the other hand is hardly expressed within this critical brain site (Vasilache et al. 2007). All of these splice variants have the capacity to cause an increase of IP₃ / Ca²⁺ in response to stimulation with 10 or more nM PGE₂, inhibition of cAMP formation even occurs after stimulation with lower doses of 1-3 nM PGE₂ (Schmid et al. 1995). It is thus tempting to speculate that the increase of glutamate-induced Ca²⁺-signals was caused by the splice variants EP_{3a} and EP_{3c}, since we used higher concentrations of PGE₂ for our experiments.

In line with the proposed existence of the PGE₂-receptor EP₃ on GABAergic neurons (Nakamura et al. 2002) we found that about 30% of those neurons, which showed enhanced glutamate-responses by administration of PGE₂, were indeed GABAergic. We have to admit that our measurements of cellular responses of primary cultures from the MnPO cannot directly be transferred to the *in vivo* situation. Still, our data support the view of the existence of GABAergic neurons in the MnPO, which are influenced by PGE₂ in a direction that is in accordance with the mentioned *in vivo* experiments.

Regarding the population of astrocytes, which responded in a similar manner (Fig. 3), we can again speculate that PGE₂ might not only enhance astrocytic responses to glutamate, but also cause enhanced Ca²⁺-dependent release of glutamate by exposure to PGE₂ (Cali et al. 2014). The released glutamate could in turn cause a stronger stimulation of the GABAergic (and other) neurons in the MnPO and, thereby, enhanced disinhibition of thermogenesis. Indeed, relevant receptors for glutamate as well as PGE₂ are present in astrocytes. Metabotropic glutamate receptors (mGlu3 and mGlu5) are the major glutamate receptors in astrocytes (Bradley and Challis 2012). Activation of these receptors evokes Ca²⁺ signals as we observed in our experiments (Biber et al. 1999). In rats, injections of kainic acid into the hippocampus induces neuronal damage and pronounced formation of PGE₂ within the lesioned brain area (Takemiya and Yamagata 2013). The PGE₂, which is produced in response to brain injury predominantly by endothelial cells, seems to activate astrocytes via the EP₃-receptor and causes elevations of [Ca²⁺]_i. As a consequence the stimulated astrocytes release glutamate in a Ca²⁺-dependent manner (Takemiya and Yamagata 2013). A similar mechanisms might operate during systemic inflammation, when there is also a pronounced formation of PGE₂, namely within the MnPO (Lazarus et al. 2007; Vasilache et al. 2015). Such an endothelial-astrocyte-neuronal signaling pathway may be critical for driving neuronal responses under inflammatory conditions. Our observation that there are two groups of astrocytes, in which opposite modulatory effects of PGE₂ on glutamate-induced Ca²⁺-signals are observed are difficult to explain at this stage. Given that EP₃ is the predominant PGE₂-receptor on astrocytes, the existence of EP₃-splice variants with distinct signaling pathways (see above), might be the key to explain this result, which indicates a dual role of PGE₂ in the responsiveness of astrocytes to glutamate.

Effects of PGE₂ on release of cytokines by cells cultured from rat OVLT and MnPO

PGE₂ is generally regarded as an important mediator of inflammation, in the periphery as well as in the brain. The coupled induction of COX-2 and mPGES-1 for the inflammatory production of PGE₂ in cells forming the blood-brain barrier is even regarded as critical for the propagation of inflammation from the periphery into the brain (Yamagata et al. 2001; Inoue et al. 2002; Ivanov and Romanovsky 2004; Rummel et al. 2011; Wilhelms et al. 2014; Vasilache et al. 2015).

Several classes of antipyretic drugs (salicylates; acetaminophen and non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) interfere with the formation of PGE₂ and provide symptom relief for fever and pain-related sickness behavior (Harden et al. 2015, for review). At least under conditions of severe disease, inhibition of PGE₂-formation can be regarded as a double-edged sword. There are indications that PGE₂ not only acts as a critical mediator of inflammation, but also represents an important feedback signal within the complex inflammatory process. In the periphery, suppression of PGE₂-formation by use of COX-inhibitors in an early stage of a given inflammatory insult enhances formation of TNF- α and might, thereby, have adverse effects on the outcome (Roth et al. 2002; Harden et al. 2015). PGE₂ is thus rather a regulator than simply a mediator of inflammation. In response to brain injury or LPS, microglial activation and TNF- α -expression in brain parenchyma are reduced by exogenous PGE₂ (Zhang and Rivest 2001). Another recent study provided evidence that PGE₂ mediates a negative feedback regulation to limit the synthesis of inflammatory mediators in a model of chronic neuroinflammation (Brenneis et al. 2011). We picked up this hypothesis and tested, whether incubation with PGE₂ or PGD₂ (a prostanoid with established anti-inflammatory capacities) modulates release of cytokines into the supernatants of LPS-stimulated OVLT and MnPO primary cultures. Indeed, we were able to show that PGE₂-exposure causes a significant attenuation of LPS-induced formation of TNF- α , to some degree also of IL-6. This effect of PGE₂ tended to be even stronger compared to PGD₂. Whether or not a reduced formation of TNF- α in the brain has pro- or anti-inflammatory effects critically depends on the type of TNF-receptor, which is predominantly activated within the area of interest. While pro-inflammatory effects are mediated via activation of the p55 (type-1) TNF-receptor, anti-inflammatory effects are exerted by interaction of TNF- α with its p75 (type-2) receptor (Kassiotis and Kollias 2001; Masli and Turie 2008).

For the neuro-glial primary culture, which we used for our experiments, it was not possible to analyze the reciprocal influence and relation between PGE₂ and cytokine-producing cells. The reason is that PGE₂ is predominantly produced by brain endothelial cells (Willems et al. 2014; Vasilache et al. 2014), which are not present in the cultures employed in this study. In our primary cultures cytokines are predominantly produced by microglial cells and to some degree by astrocytes (Wuchert et al. 2008; Ott et al. 2010). Due to the absence of endothelial cells, we had to use exogenous PGE₂ to demonstrate its inhibitory influence on the formation of cytokines. Primary cultures from OVLT and MnPO do not fully reflect the respective *in vivo* conditions, due to the isolation of cells, the lack of contact to other cells, and the lack of single cell types (here: brain endothelial cells). Organotypic brain slice cultures might allow to study functional aspects, which better reflect the *in vivo*-like situation (Humpel 2015). Still, the primary dissociated cultures, which we employed for our experiments, allow to record characteristic responses of cells from a specific brain site. With regard to the LPS-induced release of cytokines into the supernatants, the question arises of whether the PGE₂-induced modulation of Ca²⁺-signals is somehow related to its inhibitory effect on the production of TNF- α and IL-6. As mentioned above, microglial cells are of special importance for the formation of cytokines in our primary cultures. In a previous study, we obtained Ca²⁺-signals in microglial cells from the *area postrema* upon stimulation with LPS (Wuchert et al. 2008). The LPS-stimulated microglial cells also produced TNF- α *via* activation of toll-like receptor-4 (TLR4). There is a possible interplay between TLR4-stimulation by LPS, a rise in intracellular Ca²⁺ and the generation of pro-inflammatory cytokines. There is a study showing that LPS causes an increase of [Ca²⁺]_i via cyclic ADP-ribose acting as second messenger and potent Ca²⁺ mobilizer. In this study treatment of microglial cells with a cADP-ribose antagonist prevented the increase in [Ca²⁺]_i and thereby attenuated the production of TNF- α (Franco et al. 2006). A direct transfer of this mechanism to the experiments shown in the present study is, however, hardly possible since LPS-induced Ca²⁺-signals in microglial cells and their possible modulation by PGE₂ were not investigated.

CONCLUSIONS

We present a set of data showing that PGE₂ induces distinct cellular responses in primary cultures from two brain sites implicated in the manifestation of fever. The modes of action of PGE₂ on brain cells seem to be brain-site specific. Direct effects can be seen in brain sites with an incomplete blood-brain-barrier (OVLT). Here glial elements seem to be the major targets of PGE₂. Within the brain parenchyma (MnPO) the major function of PGE₂ is a modulatory one. Such a modulation of the strength of glutamate-evoked cellular signals is not restricted to neurons, but also seen in astrocytes. Future studies will have to ascribe the distinct effects, which we observed in our experiments, to the respective EP-receptor. With regard to the MnPO, where the EP₃ receptor is known to play the most important role, it will be of interest to analyze, whether dual roles of PGE₂ in neurons and astrocytes can be explained by activation of distinct splice variants of the EP₃-receptor and possibly distinct signaling pathways. The use of topographically defined organotypic brain slice cultures will allow a better understanding of the multiple interactions between different cell types (endothelial cells as producers of PGE₂, astrocytes and neurons as targets for PGE₂) within a given brain site in situations when systemic inflammation propagates into the brain.

REFERENCES

- Bastos-Pereira AL, Fraga D, Ott D, Simm B, Murgott J, Roth J, Zampronio A (2014) Involvement of brain cytokines in zymosan-induced febrile response. *J Appl Physiol* 116: 1220-1229.
- Biber K, Laurie DJ, Berthele A, Sommer B, Tölle TR, Gebicke-Härter PJ, van Calcar D, Boddeke HWGM (1999) Expression and signaling of group I metabotropic glutamate receptors in astrocytes and microglia. *J Neurochem* 72: 1671-1680.
- Blatteis CM (1992) Role of the OVLT in the febrile response to circulating pyrogens. *Prog Brain Res* 91: 409-412.
- Blatteis CM (2006) Endotoxic fever: New concepts of its regulation suggest new approaches to its management. *Pharmacol Therap* 111: 194-223.
- Bradley SJ, Challis RAJ (2012) G protein-coupled receptor signaling in astrocytes in health and disease: a focus on metabotropic glutamate receptors. *Biochem Pharmacol* 84: 249-259.
- Brenneis C, Coste O, Altenrath K, Angioni C, Schmidt H, Schuh CD, Zhang DD, Henke M, Weigert A, Brüne B, Rubin B, Nusing R, Scholich K, Geisslinger G (2011) Anti-inflammatory role of microsomal prostaglandin E synthase-1 in a model of neuroinflammation. *J Biol Chem* 286: 2331-2342.
- Cali C, Lopatar J, Petrelli F, Pucci L, Bezzi P (2014) G-protein coupled receptor-evoked glutamate exocytosis from astrocytes: Role of prostaglandins. *Neural Plasticity* Vol. 2014: Article ID 254574, 11 pages
- Damm J, Wiegand F, Harden LM, Wenisch S, Gerstberger R, Rummel C, Roth J (2014) Intraperitoneal and subcutaneous injections of the TLR9 agonist ODN 1668 in rats: brain inflammatory responses are related to peripheral IL-6 rather than interferons. *J Neuroimmunol* 277: 105-117.
- Franco L, Bodrato N, Moreschi I, Usai C, Buzzzone S, Scarf S, Zocchi E, De Flora A (2006) Cycliuc ADP-ribose is a second messenger in the lipopolysaccharide-stimulated activation of murine N9 microglial cell line. *J Neurochem* 99: 165-176.

- Gonchar Y, Wang Q, Burkhalter A (2008) Multiple distinct subtypes of GABAergic neurons in mouse visual cortex identified by triple immunostaining. *Front Neuroanat* 1: 3.
- Harden LM, Kent S, Pittman QJ, Roth J (2015) Fever and sickness behavior: Friend or foe? *Brain Behav Immun* 50: 322-333.
- Hatae N, Sugimoto Y, Ichikawa A (2002) Prostaglandin receptors: Advances in the study of EP3 receptor signaling. *J Biochem* 131: 781-784.
- Humpel C (2015) Organotypic brain slice cultures: a review. *Neuroscience* 305: 86-98.
- Inoue W, Matsumura K, Yamagata K, Takemiya T, Shiraki T, Kobayashi S (2002) Brain-specific endothelial induction of prostaglandin E(2) synthesis enzymes and its temporal relation to fever. *Neurosci Res* 44: 51-61.
- Ivanov AI, Romanovsky AA (2004) Prostaglandin E2 as a mediator of fever: synthesis and catabolism. *Front Biosci* 9: 1977-1993.
- Kassiotis G, Kollias G (2001) Uncoupling the proinflammatory from the immunosuppressive properties of tumor necrosis factor (TNF) at the p55 TNF receptor level: implications for pathogenesis and therapy of autoimmune demyelination. *J. Exp. Med.* 193: 427-434.
- Katafuchi T, Duan S, Take S, Yoshimura M (2005) Modulation of glutamate-induced outward current by prostaglandin E2 in rat dissociated preoptic neurons. *Brain Res* 1037: 180-186.
- Kopp MDA, Meissl H, Dehghani F, Korf HW (2001) The pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide modulates glutaminergic calcium signalling: investigations on rat suprachiasmatic nucleus neurons. *J Neurochem* 79: 161-171.
- Kotani M, Tanaka I, Ogawa Y, Usui T, Mori K, Ichikawa A, Narumiya S, Yoshimi T, Nakao K (1995) Molecular cloning and expression of multiple isoforms of human prostaglandin E receptor EP3 subtype generated by alternative messenger RNA splicing: multiple second messenger systems and tissue specific distributions. *Mol Pharmacol* 48:869-879.

- Lacroix A, Toussay X, Anenberg E, Lecrux C, Ferreiros N, Karagiannis A, Plaisier F, Chausson P, Jarlier F, Burgess SA, Hillman EMC, Tegeder I, Murphy TH, Hamen E, Cauli B (2015) COX-2-derived prostaglandin E2 produced by pyramidal neurons contribute to neurovascular coupling in the rodent cerebral cortex. *J Neurosci* 35: 11791-11810.
- Lazarus M (2006) The differential role of prostaglandin E2 receptors EP3 and EP4 in regulation of fever. *Mol Nutr Food Res* 50: 451-455.
- Lazarus M, Yoshida K, Coppari R, Bass CE, Mochizuki T, Lowell BB, Saper CB (2007) EP3 prostaglandin receptors in the median preoptic nucleus are critical for fever response. *Nat Neurosci* 10: 1131-1133.
- Li Z, Perlik V, Feleder C, Tang Y, Blatteis CM (2006) Kupffer cell-generated PGE2 triggers the febrile response of guinea pigs to intravenously injected LPS. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290: R1262-R1270.
- Maric D, Liu QJ, Maric I, Chaudry S, Chang YH, Smith SV, Sieghart W, Fritschy JM, Barker JL (2001) GABA expression dominates neuronal lineage progression in the embryonic rat neocortex and facilitates neurite outgrowth via GABA_A autoreceptor / Cl⁻ channels. *J Neurosci* 21: 2343-2360.
- Masli S, Turpie B (2008) Anti-inflammatory effects of tumor necrosis factor (TNF)- α are mediated via TNF-R2 (p75) in tolerogenic transforming growth factor- α -treated antigen-presenting cells. *Immunology* 127, 62-72.
- Matsumura K, Watanabe Y, Onoe H, Watanabe Y, Hayaishi O (1990) High density of prostaglandin E₂ binding sites in the anterior wall of the 3rd ventricle: a possible site of its hyperthermic action. *Brain Res* 533: 147-151.
- McKinley MJ, Yao ST, Uschakov A, McAllen RM, Rundgren M, Martelli D (2015) The median preoptic nucleus: front and centre for the regulation of body fluid, sodium, temperature, sleep and cardiovascular homeostasis. *Acta Physiol (Oxf.)* 214: 8-32.
- Morrison SF, Nakamura K (2011) Central neural pathways for thermoregulation. *Front Biosci* 16: 74-104.
- Nakamura K (2011) central circuitries for body temperature regulation and fever. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 301: R1207-R1228.

- Nakamura K, Matsumura K, Kaneko T, Kobayashi S, Katoh H, Negeshi M (2002) The rostral raphe pallidus nucleus mediates pyrogenic transmission from the preoptic area. *J Neurosci* 22: 4600-4610.
- Nakamura K, Morrison SF (2008) A thermosensory pathway that controls body temperature. *Nat Neurosci* 11: 62-71.
- Nakamura Y, Nakamura K, Matsumura K, Kobayashi S, Kaneko T, Morrison SF (2005) Direct pyrogenic input from prostaglandin EP3 receptor-expressing preoptic neurons to the dorsomedial hypothalamus. *Eur J Neurosci* 22: 3137-3146.
- Obrietan K, Belousov AB, Heller HC, Van den Pol AN (1995) Adenosine pre- and postsynaptic modulation of glutamate-dependent calcium activity in hypothalamic neurons. *J Neurophysiol* 74: 2150-2162.
- Oka T (2004) Prostaglandin E₂ as a mediator of fever: The role of prostaglandin E (EP) receptors. *Front Biosci* 9: 3046-3057.
- Oka T, Oka K, Kobayashi T, Sugimoto Y, Ichikawa A, Ichikawa A, Ushikubi F, Narumiya S, Saper CB (2003) Characteristics of thermoregulatory and febrile responses in mice deficient in prostaglandin EP1 and EP3 receptors. *J Physiol* 551.3: 945-954.
- Oka T, Oka K, Scammell TE, Lee C, Kelly JF, Nantel F, Elmquist JK, Saper CB (2000) Relationship of EP (1-4) prostaglandin receptors with rat hypothalamic cell groups involved in lipopolysaccharide fever responses. *J Comp Neurol* 428: 20-32.
- Ott D, Murgott J, Rafalzik S, Wuchert F, Schmalenbeck B, Roth J, Gerstberger R (2012) Neurons and glial cells of the rat *organum vasculosum laminae terminalis* directly respond to lipopolysaccharide and pyrogenic cytokines. *Brain Res* 1363: 93-106.
- Ott D, Simm B, Pollatzek E, Gerstberger R, Rummel C, Roth J (2015) Prostaglandin D2 modulates calcium signals induced by prostaglandin E2 in neurons of rat dorsal root ganglia. *Neurosci Lett* 597: 159-163.
- Paxinos G, Watson C (2005) The rat brain in stereotaxic coordinates. 5th ed. San Diego: Academic Press.
- Pecchi E, Dallaporta M, Jean A, Thirion S, Troadec JD (2009) Prostaglandins and sickness behavior: Old story, new insights. *Physiol Behav* 97: 279-292.

- Roth J, Blatteis CM (2014) Mechanisms of fever production and lysis: Lessons from experimental LPS fever. *Compr Physiol* 4: 1563-1604.
- Roth J, Harré EM, Rummel C, Gerstberger R, Hübschle T (2004) Signaling the brain in systemic inflammation: Role of sensory circumventricular organs. *Front Biosci* 9: 290-300
- Roth J, Hübschle T, Pehl U, Ross G, Gerstberger R (2002) Influence of systemic treatment with cyclooxygenase inhibitors on lipopolysaccharide-induced fever and circulating levels of cytokines and cortisol in guinea pigs. *Pflügers Arch – Eur J Physiol* 443: 411-417.
- Rummel C (2015) Inflammatory transcription factors as activation markers and functional readouts in immune-to-brain communication. *Brain Behav Immun*: in press (doi:10.1016/j.bbi.2015.09.003).
- Rummel C, Matsumura K, Luheshi GN (2011) Circulating IL-6 contributes to peripheral LPS-induced mPGES-1 expression in the rat brain. *Brain Res Bull* 86: 319-325.
- Saper CB, Romanovsky AA, Scammell TE (2012) Neural circuitry engaged by prostaglandins during the sickness syndrome. *Nat Neurosci* 15: 1088-1095.
- Scammell TE, Elmquist JK, Griffin JD, Saper CB (1996) Ventromedial preoptic prostaglandin E2 activates fever-producing autonomic pathways. *J Neurosci* 16: 6246-6254.
- Schmid A, Thierauch KH, Schleuning WD, Dinter H (1995) Splice variants of the human EP3 receptor for prostaglandin E2. *Eur J Biochem* 228: 23-30.
- Soares DM, Ott D, Melo MC, Souza GE, Roth J (2013) Chemokine ligand (CCL)-3 promotes an integrated febrile response when injected within pre-optic area (POA) of rats and induces calcium signaling in cells of POA microcultures but not TNF- α or IL-6 synthesis. *Brain Behav Immun* 34: 120-129.
- Steiner AA, Ivanov AI, Serrats J, Hosokawa H, Phayre AN, Robbins JR, Roberts JL, Kobayashi S, Matsumura K, Sawchenko PE, Romanovsky AA (2006) Cellular and molecular basis of the initiation of fever. *PLoS Biol* 4, e284.
- Takemiya T, Yamagata K (2013) Intercellular signaling pathway among endothelia, astrocytes and neurons in excitatory neuronal damage. *Int J Mol Sci* 14: 8345-8357.

- Ushikubi F, Hirata M, Narumiya S (1995) Molecular biology of prostanoid receptors: an overview. *J Lipid Med Cell Signal* 12: 343-359.
- Ushikubi F, Segi E, Sugimoto Y, Murata T, Matsuoka T, Kobayashi T, Hizaki H, Tuboi K, Katsuyama M, Ichikawa A, Tanaka T, Yoshida N, Narumiya S (1998) Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP₃. *Nature* 395: 281-284.
- Vasilache AM, Andersson J, Nilsberth C (2007) Expression of PGE₂ EP₃ receptor subtypes in the mouse preoptic region. *Neurosci Lett* 423: 179-183.
- Vasilache AM, Qian H, Blomqvist A (2015) Immune challenge by intraperitoneal administration of lipopolysaccharide directs gene expression in distinct blood-brain barrier cells towards enhanced prostaglandin E₂ signaling. *Brain Behav Immun* 48: 31-41.
- Welsch J, Hübschle T, Murgott J, Kirschning C, Rummel C, Gerstberger R, Roth J (2012) Fever induction by systemic stimulation with macrophage-activating lipopeptide-2 depends upon TLR2 but not CD36. *Innate Immun* 18: 541-559.
- Wilhelms DB, Kirilov M, Mirrasekhian E, Eskilsson A, Kugelberg UÖ, Klar C, Ridder DA, Herschman HR, Schwaninger M, Blomqvist A, Engblom D (2014) Deletion of prostaglandin E₂ synthesizing enzymes in brain endothelial cells attenuates inflammatory fever. *J Neurosci* 34: 11684-11690.
- Williams JW, Rudy TA, Yaksh TL, Viswanathan CT (1977) An extensive exploration of the rat brain for sites mediating prostaglandin-induced hyperthermia. *Brain Res* 120: 251-262.
- Wuchert F, Ott D, Murgott J, Rafalzik S, Hitzel N, Roth J, Gerstberger R (2008) Rat area postrema microglial cells act as sensors for the Toll-like receptor-4 agonist lipopolysaccharide. *J Neuroimmunol* 204: 66-74.
- Yamagata K, Matsumura K, Inoue W, Shiraki T, Suzuki K, Yasuda S, Sugiura H, Cao C, Watanabe Y, Kobayashi S (2001) Coexpression of microsomal-type prostaglandin E synthase with cyclooxygenase-2 in brain endothelial cells of rats during endotoxin-induced fever. *J Neurosci* 21: 2669-2677.

Zhang J, Rivest S (2001) Anti-inflammatory effects of prostaglandin E2 in the central nervous system in response to brain injury and circulating lipopolysaccharide. J Neurochem 76: 855-864.

D. MATERIAL UND METHODEN

Im Rahmen dieses Dissertationsprojekts wurde die Methode der Kultivierung und experimentellen Untersuchung von Primärkulturen von Neuronen aus Spinalganglien neu etabliert. Auch das für alle drei untersuchten Strukturen angewandte Untersuchungsschema zur Analyse einer möglichen Modulation der Stärke Glutamat-induzierter Ca^{2+} -Signale durch Prostaglandine wurde bislang innerhalb der Arbeitsgruppe noch nicht durchgeführt. Da diese Versuchsabläufe in Publikationen nicht so ausführlich beschrieben werden können, dass man sie anhand der vergleichsweise kurzen Beschreibung exakt wiederholen könnte, wurde die Sektion „Material und Methoden“ daher so ausführlich wie in einer nicht-kumulativen Dissertation abgefasst.

1. Material

1.1. Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Absaugpumpe	Minni A	Leybold-Heraeus, D-Hanau
Autoklav	2540 EL	Systec, D-Wettenberg
Binokular mit Kamera	SMZ-U	Nikon Deutschland, D-Düsseldorf
Binokular	Stemi SV 11	Carl Zeiss AG, D-Oberkochen
Bipolarer Temperatur- Controller	CL-100	Warner Instruments, Hamden, CT, USA
Brutschrank	NuAire™ USAutoflow	NuAire Inc., Plymouth, MN, USA
Calcium-Imaging-System bestehend aus:		Visitron Systems GmbH, D-Puchheim

Digitale schwarz/weiß Kamera	Spot Pursuit, Model 23.0	Visitron Systems GmbH, D-Puchheim
Filterrad + Steuereinheit	MAC 5000	Ludl Electronic Products Ltd, New York, NY, USA
Fluoreszenzlampe	BH2-RFL-T3	Olympus Optical, D-Hamburg
Inverses Mikroskop	IMT-2	Olympus Optical, D-Hamburg
Kompressor	Silent 30	MAGV, D-Rabenau
Kondensor	IMT-NAC 2	Olympus Optical, D-Hamburg
Schwingungsfreier Tisch	WS-5	TMC, Peabody, MA, USA
Teflon Zellkultur Messkammer		Werkstatt Kerckhoff Institut, D-Bad Nauheim
Wechselspannungs- stabilisator		Wandel & Goltermann, D-Reutlingen
CO ₂ -Inkubator	BB-15 Function Line	Thermo Scientific, D-Dreieich
Eismaschine	Icematic F120 und D100	CastelMAC S.p.A., I-Castefranco Veneto
Fluoreszenzmikroskop mit:	BX50	Olympus Optical, D-Hamburg
Digitale schwarz/weiß Kamera	Spot Insight, Model 3.1.0	Visitron Systems GmbH, D-Puchheim
Heißluftsterilisator	ED 115/E2	Binder GmbH, D-Tuttlingen
Mikroplatten Photometer	Digiscan	Asys Hitech, A-Eugendorf
Mikroskop	Fluovert FU	Leica Microsystems, D-Wetzlar
Mikrozentrifuge	Force 7	Denver Instrument, Bohemia, NY, USA

Peltier Kühlung		Werkstatt Kerckhoff Institut, D-Bad Nauheim
pH-Meter	inoLab® 7110	WTW GmbH, D-Weilheim
Pipetten	8-Kanal, 500-2500, 200-1000, 100-1000, 10-100, 20-200, 2-20, 2-10 µl	Eppendorf AG, D-Hamburg
Pipetten	20-, 200-, 0,5-2 µl	Gilson Inc., Middleton, WI, USA
Pipettierhilfe	Pipetboy	Integra Biosciences GmbH, D-Fernwald
Reinstwassersystem	Milli-Q Biocel	Millipore, D-Eschborn
Schlauchpumpe	Minipuls-3	Abimed Analysen Technik GmbH, D-Langenfeld
Schüttelapparat	3006	GFL GmbH, D-Burgwedel
Schwanenhalslampe	KL 1500	Schott AG, D-Mainz
Sicherheits-Bunsenbrenner	Fireboy eco	Integra Biosciences GmbH, D-Fernwald
Solution In-Line Heater/Cooler Two Line		Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA
Sterilbank	Microflow Biological Safety Cabinet	Thermo Scientific, D-Dreieich
Thermoblock	QBT	VWR, D-Darmstadt
Tischrühr- und Heizgerät	HI 300N	HANNA Instruments, Woonsocket, RI, USA
Tischrühr- und Heizgerät	RCT Basic	IKA® Werke GmbH & Co, KG, D-Staufen
Ultraschall-Wasserbad	EMMI 30	EMAG AG, D-Mörfelden- Waldorf
Vibratom	TSE 550752/M	Technical & Scientific GmbH, D-Kronberg
Vortexmischer	VF und VF2	IKA® Werke GmbH & Co, KG, D-Staufen

Waagen	AE 50 und PM 2500	Mettler Toledo, D-Gießen
Zentrifuge	Mikro Rapid / K	Hettich GmbH & Co. KG, D-Tuttlingen

1.2. Ge- und Verbrauchsmaterial

1.2.1. Allgemein

Name	Typ	Hersteller
Bechergläser	Klasse A	Roth GmbH, D-Karlsruhe
Einmalhandschuhe	Latex	Unigloves GmbH, D-Troisdorf
Einmalhandschuhe	N-Dex [®] / Nitril	Showa Best Glove, Menlo, GA, USA
Einwegpasteurpipetten	3 ml	MAGV, D-Rabenau
Glasflaschen	500-, 1000-, 2000 ml	Schott AG, D-Mainz
Labortücher	Kimtech, fusselfrei	Kimberly-Clark, D-Mainz
Magnetrührstäbchen	PTFE ummantelt	Roth GmbH, D-Karlsruhe
Messkolben	Klasse A, 1-, 2- und 5 l	Roth GmbH, D-Karlsruhe
Messzylinder	Klasse A, 100- und 250- ml	Roth GmbH, D-Karlsruhe
Parafilm [®]		Roth GmbH, D-Karlsruhe
Pipettenspitzen	verschiedene Größen	MAGV, D-Rabenau
Reaktionsgefäße	2-, 1,5- und 0,5- ml	Eppendorf AG, D-Hamburg
Reaktionsgefäßständer		Roth GmbH, D-Karlsruhe
Serologische Pipetten	1-, 5-, 10-, 25- und 50 ml	Sarstedt, D-Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen	Steril, 15- und 50 ml	Sarstedt, D-Nümbrecht

1.2.2. Tierhaltung

Name	Typ	Hersteller
Einstreu für Tierkäfige	Lignocel	JRS, GmbH, D-Rosenberg
Polycarbonatkäfige	Typ III	Fa. Dipl.-Ing. W. Ehret GmbH, D-Emmendingen
Polycarbonatkäfige	Typ IV	Fa. Dipl.-Ing. W. Ehret GmbH, D-Emmendingen
Standard Rattenfutter	R-Z V1324-000	Ssniff, D-Soest

1.2.3. Zellkultur und Calcium-Imaging

Name	Typ	Hersteller
Cellocate®		Eppendorf AG, D-Hamburg
CELL-VU	25 x 25 mm Grid Coverslips DRM800	Millenium Sciences, New York, NY, USA
Deckgläschen	15 x 15 mm Stärke 1	Menzel GmbH, D-Braunschweig
Einmalkanülen	18 G und 22 G	B. Braun, D-Melsungen
Einmalskalpellklingen		Otto Rüttgers GmbH & Co. KG, D-Solingen
Einwegspritzen	5 und 20 ml	B. Braun, D-Melsungen
Einwegspritzen	1 ml	BD, D-Heidelberg
Filterpapier	Ø 10 cm	Macherey-Nagel, D-Düren
Gewebekleber	Histoacryl	B. Braun, D-Melsungen
Hahnenbank	5-fach	Pub Medizintechnik, D-Kirchseen
Irisschere, fein	gerade	Fine Science Tools GmbH, D-Heidelberg
Nachstarschere	Vannas	Fine Science Tools GmbH, D-Heidelberg

Pasteurpipetten	230 mm aus Glas	MAGV, D-Rabenau
Petrischale	Glas, Ø 11 cm	MAGV, D-Rabenau
Petrischale	Plastik, 100 x 20 und 35 x 10 mm	Sarstedt, D-Nümbrecht
Pinzette	Dumont # 5, gerade	Fine Science Tools GmbH, D-Heidelberg
Rasierklingen	752/1/SS	Campden Instruments Ltd., GB-Loughborough
Spatel, fein	gebogen	Fine Science Tools GmbH, D-Heidelberg
Sterilfilter	FP 30/0,2 CA-S	Schleicher und Schuell GmbH, D-Dassel
Teflonschläuche	Innendurchmesser 0,75 und 1,98 mm	Kronlab, D-Sinsheim
Tygon Schläuche für Schlauchpumpe		Abimed Analysen Technik GmbH, D-Langenfeld
Zählkammer (Neubauer)	C-Chip	NanoEnTek, Inc., Seoul, Korea
Zellkulturkammer	flexiPERM micro 12, 0,35 ml Volumen / Kammer	Greiner-Bio One GmbH, D-Frickenhausen

1.2.4. Immunzytochemie

Name	Typ	Hersteller
Inkubationskasten mit Deckel	20 x 30 x 5 cm	Biochem Instrumente GmbH, D-Weilburg
Multi-Dishplatten	8 Wells	Nalge Nunc International, Pennfield, NY, USA
Multi-Wellplatten	12 Wells	Greiner-Bio One GmbH, D-Frickenhausen
Objektträger	76 x 26 mm	Menzel GmbH, D-Braunschweig

Objektträgermappe	für 20 Objektträger	LAT-Labor- und Analysen-Technik GmbH, D-Garbsen
-------------------	---------------------	---

1.2.5. TNF- α und IL-6 Bioassays

Name	Typ	Hersteller
Multi-Wellplatten	96 Wells	Sarstedt, D-Nümbrecht
Zellkulturflaschen		PAA GmbH, A-Pasching

1.3. Chemikalien und Substanzen

Bezeichnung	Hersteller
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)- Ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
2-Mercaptoethanol	Merck KGaA, D-Darmstadt
2-Propanol	Merck KGaA, D-Darmstadt
3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5- diphenyl-2H-tetrazoliumbromid (MTT)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
4',6-Diamidin-2-Phenylindol Dilaktat (DAPI)	Life Technologies GmbH, D-Darmstadt
Actinomycin D	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Aqua-Stabil	Julabo Labortechnik GmbH, D-Seelbach
B27	Life Technologies GmbH, D-Darmstadt
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck KGaA, D-Darmstadt
Carbogen	Praxair GmbH, D-Düsseldorf
Citifluor	Citifluor Ltd., GB-London
Collagenase Typ II CLS II	Biochrom AG, D-Berlin
D-Glucose Monohydrat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dispase I	Roche Diagnostics GmbH, D-Mannheim

Dispase II	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	PAA GmbH, A-Pasching
Ethanol absolut (abs. ETOH)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ethanol, vergällt (ETOH)	Stockmeier GmbH & Co. KG, D-Dillenburg
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Fetales Kälberserum (FKS)	PAA GmbH, A-Pasching
Fura-2-acetoxymethylester (Fura-2AM)	Life Technologies GmbH, D-Darmstadt
Gentamycin	Biochrom AG, D-Berlin
Gey's Balanced Salt Solution (GBSS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) Ca ²⁺ - und Mg ²⁺ -frei	Biochrom AG, D-Berlin
Isopropanol / HCl – Lösung	Merck KGaA, D-Darmstadt
Kalibrierlösung für pH-Meter: pH 4,01 / 7,00 / 10,01	WTW GmbH, D-Weilheim
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
L-Glutamat, Monosodiumsalz	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
L-Glutamin	Life Technologies GmbH, D-Darmstadt
Lipopolysaccharid (E. coli, Serotyp 0111:B4)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Menthol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natronlauge (NaOH)	Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe
Neurobasal-A Medium (NBA)	Life Technologies GmbH, D-Darmstadt
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Penicillin / Streptomycin	Life Technologies GmbH, D-Darmstadt
Phosphate Buffered Saline (PBS) Tablets	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Poly-L-Lysin	Biochrom AG, D-Berlin
Prostaglandin D ₂ (PGD ₂)	Enzo Life Sciences GmbH, D-Lörrach
Prostaglandin E ₂ (PGE ₂)	Enzo Life Sciences GmbH, D-Lörrach
Salzsäure (HCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, D-Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Trypanblau	ICN Biomedicals Inc, Costa Mesa, CA, USA
Wasser, steril (<i>Aqua bidest.</i>)	Reinstwassersystem im Haus

1.4. Software

Name	Version	Hersteller
Adobe Photoshop	CS2	Adobe Systems GmbH, D-Unterschleißheim
Citavi	4	Swiss Academic Software, CH-Wädenswil
Graph Pad Prism®	5.0.2	GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA
Metafluor	7.7.8.0	Visitron Systems GmbH, D-Puchheim
Metamorph	7.7.5.0	Visitron Systems GmbH, D-Puchheim
Microsoft Office Excel	2003 / 2013	Microsoft Corporation, D-Unterschleißheim
Microsoft Office Word	2003 / 2013	Microsoft Corporation, D-Unterschleißheim

2. Versuchstiere

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden Wistar Ratten aus der institutseigenen Zucht verwendet, deren Elterntiere von der Charles River (WIGA) GmbH in Sulzfeld bezogen wurden. Die Aufzucht und die Haltung der Tiere fand bei einer konstanten Raumtemperatur von 23 ± 1 °C, einer relativen Luftfeuchte von 50 % und einem 12 / 12 Stunden hell / dunkel Rhythmus (Licht von 07:00 bis 19:00 Uhr) statt. Die Jungtiere wurden gemeinsam mit dem Muttertier in transparenten Typ IV Polycarbonat-Käfigen gehalten. Nach dem Absetzen (110 ± 10 g Körpergewicht) wurden

die Tiere nach Geschlechtern getrennt und in Gruppen von bis zu 5 Tieren in transparenten Typ III Polycarbonat-Käfigen gehalten. Wasser und Rattenzuchtfutter standen während der gesamten Zeit *ad libitum* zur Verfügung.

Für die Versuche an den primären neuroglialen Zellkulturen des MnPO und des OVLT wurden neonatale Ratten beiderlei Geschlechts mit einem Alter von 4 – 6 Tagen verwendet. Für die Etablierung der primären neuroglialen Zellkulturen der Spinalganglien wurden Ratten beiderlei Geschlechts mit einem Alter von 5 – 6 Wochen verwendet. Die Tötung der neonatalen Ratten wurde unter GI 18/2-Nr. A33/2012 (527_AZ) und GI 18/2 (443_AZ) angezeigt. Die Entnahme des Gewebes für die Etablierung der Spinalganglienkulturen fand aus Ratten statt, deren Tötung unter GI 18/2-Nr. A57/2011 und 486_M angezeigt wurde.

3. Methoden

3.1. Primäre Zellkultur

Wie bereits in der Einleitung erläutert, spielt die präoptische Region des Hypothalamus eine zentrale Rolle in der Thermoregulation (Boulant und Hardy 1974; Hammel 1968; Hayward und Baker 1968). Auch auf die Rolle der Prostaglandine E₂ und D₂ im Rahmen der Thermoregulation (Coceani et al. 1986; Coceani et al. 1988; Gao et al. 2009a; Milton 1998; Milton und Wendlandt 1971; Mouihate et al. 2004) und deren Wirkung über ihre spezifischen Rezeptoren (Joo und Sadikot 2012; Oka et al. 2003a; Scher und Pillinger 2009; Ushikubi et al. 1998) wurde dort bereits eingegangen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die modulatorische Wirkung der Prostaglandine E₂ und D₂ auf einen Teilbereich der präoptischen Region, den MnPO, untersucht. Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen haben die Bedeutung dieses Kerngebietes im Regelkreis der Thermoregulation bereits gezeigt (Nakamura 2011; Nakamura und Morrison 2008a; Yoshida et al. 2009). Von besonderem Interesse ist hierbei die hohe Dichte des PGE₂ Rezeptors EP₃ im Bereich des MnPO (Nakamura et al. 2000).

Neben dem MnPO wurde die modulatorische Wirkung der Prostaglandine E₂ und D₂ auf das OVLT untersucht. Das OVLT liegt in direkter Nachbarschaft zum MnPO in der anteroventralen Wand des dritten Ventrikels (AV3V) und zählt zu den zirkumventrikulären Organen. Dies bedeutet, dass es über eine durchlässige Blut-Hirn-Schranke verfügt und somit direkten Kontakt zu zirkulierenden Stoffen wie zum Beispiel Zytokinen und auch Prostaglandinen hat. Das OVLT gilt daher als mögliche Eintrittspforte für zirkulierendes PGE₂ (Blatteis et al. 1983; Hellon und Townsend 1982), welches von dort aus Einfluss auf Zellen des MnPO nehmen könnte. Weiterhin wurden auch im OVLT Zellen mit PGE₂ Rezeptoren des Typs EP₃ gefunden, die als eine Verlängerung der EP₃ positiven Zellpopulation des MnPO angesehen werden (Lazarus et al. 2007).

Mit dem MnPO und dem OVLT wurden zwei Strukturen des zentralen Nervensystems untersucht. Wie jedoch bereits in der Einleitung beschrieben, besteht das thermoregulatorische System nicht nur aus zentralen, sondern auch aus peripheren Anteilen. Einer dieser Anteile sind die Nervenknotten der Nervenzellen des peripheren Nervensystems, die sogenannten Spinalganglien (Dorsal Root Ganglion / DRG). Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass Zellen der Spinalganglien über Rezeptoren für PGE₂ verfügen (Nakamura et al. 2000; Natura et al. 2013; Southall und Vasko 2001) und dass PGE₂ die Reaktionen dieser Zellen beeinflussen kann (Linté et al. 2007; Stucky et al. 1996).

Zur experimentellen *in vitro* Untersuchung der Beeinflussung dieser zentralen und peripheren thermoregulatorischen Neurone durch die Prostaglandine E₂ und D₂ wurden neurogliale Primärkulturen des MnPO, des OVLT und der Spinalganglien angelegt, welche als Grundlage für weitere Untersuchungen dienten. Hierbei ist zu beachten, dass es sich bei den Primärkulturen des MnPO und des OVLT niemals um Reinkulturen handelte. Durch die Präparationstechnik bedingt war es unvermeidlich, dass auch Zellen aus Gehirnregionen in die Zellkultur gelangten, welche an das MnPO und das OVLT angrenzen. Aus diesem Grund handelte es sich, wenn im Rahmen dieser Arbeit von Primärkulturen gesprochen wird, um MnPO- bzw. OVLT-angereicherte Primärkulturen. Als Grundlage für Herstellung dieser Primärkulturen dienten Vorarbeiten am Institut, die auf den Erfahrungen des Max-Planck-Instituts für physiologische und klinische Forschung basierten (Jurzak et al. 1994). So wurden am Institut im Rahmen vorhergehender Arbeiten bereits erfolgreich MnPO- (Hitzel 2009) und OVLT-

angereicherte (Ott et al. 2010) Primärkulturen angelegt. Die neurogliale Primärkultur der Spinalganglien wurde im Rahmen dieser Arbeit neu etabliert. Auch hier dienten die in der Vergangenheit gesammelten Erfahrungen als Grundlage. Diese wurden mit Hilfe von Protokollen anderer Arbeitsgruppen erfolgreich angepasst (Babes et al. 2004; Linte et al. 2007; Reid et al. 2002; Rossbach et al. 2011).

3.1.1. Primäre neurogliale Zellkultur des *Nucleus medianus praeopticus* (MnPO) und des *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLt)

3.1.1.1. Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
Neurobasal-A (NBA) Zellkulturmedium	Neurobasal-A Medium B 27 (Endkonzentration 2%) Penicillin/Streptomycin (100 µg/ml) L-Glutamin (2 mM)
GBSS – Puffer	GBSS Glucose (0,5%)
HBSS – Puffer	HBSS HEPES (20 mM)
Enzymlösung	HBSS – Puffer Dispase I (2,4 U/ml)
Inaktivierungslösung	HBSS – Puffer EDTA (1 mM)

3.1.1.2. Ablauf

Vorbereitend wurden am Tag vor der eigentlichen Präparation Kultivierungssysteme für die Zellen fertiggestellt. Dieser, wie auch spätere Arbeitsschritte, wurden zur Gewährleistung einer keimarmen Arbeitsumgebung unter einer sterilen Arbeitsbank durchgeführt. Die benutzten Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße wurden vorher

autoklaviert. Das Kultivierungssystem bestand aus flexiPERM micro 12 Kammern mit einer Grundfläche von 28 mm², welche in 70% Ethanol desinfiziert wurden. Auf die glatte Unterseite dieser flexiblen Mikrozellkulturkammern wurden mit einer Pinzette unterschiedliche Arten von Deckgläsern als Boden zentriert angebracht. Für die Verwendung in den Stimulationsversuchen wurden einfache Deckgläschen (15 x 15 mm) benutzt, während für die Verwendung in den Calcium-Imaging Versuchen CELL-VU Gläschen zum Einsatz kamen. Diese verfügen über ein lasergraviertes Raster, mit welchem die untersuchten Zellen nach dem eigentlichen Versuch einfacher wiedergefunden werden können. Alle Deckgläschen wurden vor ihrer Verwendung in 1 N Salzsäure und in 70% Ethanol gewaschen, unter der sterilen Arbeitsbank abgeflammt und dort aufbewahrt. Zur Gewährleistung eines optimalen Anheftens und Anwachsens der Zellen wurden die Deckgläser nach dem Anbringen an die Mikrozellkulturkammern mit 200 µl Poly-L-Lysin beschichtet und in Petrischalen für 12 Stunden bei 4 °C lichtgeschützt aufbewahrt. Am folgenden Tag wurden die Reste des Poly-L-Lysins mit Hilfe einer sterilen Pipette und eines Pumpensystems unter der sterilen Arbeitsbank abgesaugt und die Mikrozellkulturkammern mit sterilem, entionisiertem Wasser gewaschen. Bis zu ihrer weiteren Verwendung wurden sie bei 37 °C im Brutschrank aufbewahrt.

Am folgenden Tag wurden die benötigten Lösungen und Puffer in 50 ml Zentrifugenröhrchen angesetzt. Das mit den Supplementen versetzte Zellkulturmedium wurde in einem Wärmeblock auf 37 °C erwärmt, während der GBSS – und der HBSS – Puffer für 20 min auf Eis über ein Schlauchsystem mit Carbogen begast wurden. 10 ml des HBSS – Puffers wurden danach zur späteren Verwendung als Inaktivierungslösung mit 1 mM EDTA versetzt und im Wärmeblock auf 37 °C erwärmt.

Die eigentliche Präparation wurde mit hitzesterilisierten Instrumenten an mit 70% Ethanol desinfizierten Arbeitsplätzen durchgeführt. Die vier bis sechs Tage alten Wistar – Ratten wurden mit einer Schere dekapitiert und der abgetrennte Kopf für weniger als 1 Minute in ein Becherglas mit eiskaltem 70% Ethanol überführt. Der Kopf wurde danach mit einer Pinzette in einer Petrischale fixiert, die Kopfhaut mit einer Einmalskalpellklinge eingeschnitten und mit einer Pinzette vom Schädel entfernt. Mit Hilfe einer Irisschere wurde die Schädeldecke ringsum vorsichtig eingeschnitten und mit einer Pinzette nach kaudal geklappt. Das nun freiliegende Gehirn wurde mit einer weiteren Einmalskalpellklinge durch einen Coronalschnitt auf Höhe der Zirbeldrüse in zwei Teile

getrennt. Mit einem Spatel wurde der vordere Teil des Gehirns vorsichtig in rostrocaudaler Richtung aus dem Schädel gelöst. Um zu verhindern, dass durch zu starken Zug auf die *Nervi optici* die Region, welche das OVLT beinhaltet, abbriss, wurden diese mit einer Schere durchtrennt und das Gehirn vollständig aus dem Schädel gelöst. Zur Aufbewahrung wurde das Gehirn in eine Petrischale mit eiskaltem oxygeniertem GBSS überführt.

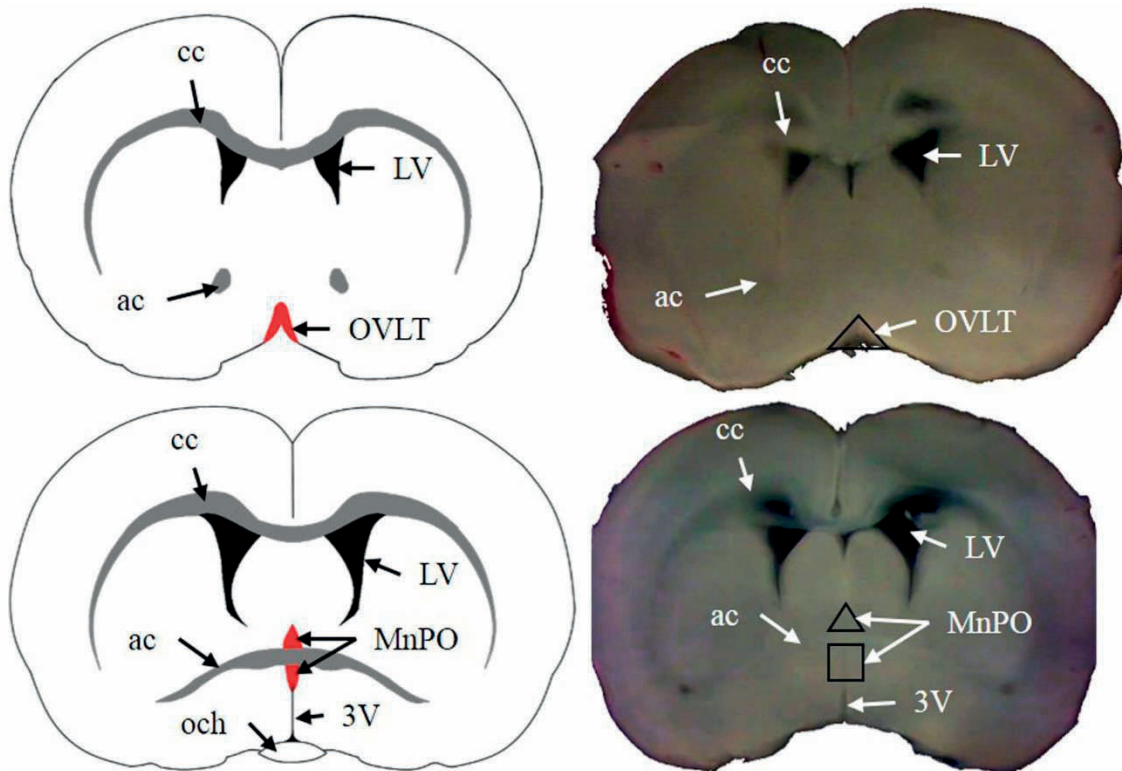


Abbildung 8: Lokalisation des Organums vasculosum laminae terminalis und des Nucleus medianus praeopticus

Links: Schematische Darstellungen des Organums vasculosum laminae terminalis und des Nucleus medianus praeopticus im coronalen Querschnitt des Gehirns der Ratte (jeweils rot). Schema modifiziert nach Paxinos & Watson (2005).

Rechts: Frischgewebeschnitte von neonatalen Rattengehirnen (d 4 – 6) mit den markierten Exzisionsstellen.

3V = dritter Ventrikel, ac = Commissura anterior, cc = Corpus callosum, LV = lateraler Ventrikel, MnPO = Nucleus medianus praeopticus, och = Chiasma opticum, OVLT = Organum vasculosum laminae terminalis

Mit Hilfe zweier Spatel wurde das Gehirn mit der Schnittfläche durch Gewebekleber (Histoacryl) auf einem Teflonblock fixiert und dieser in die Kammer des Vibratoms eingebaut. Die Kammer war bereits mit gekühltem (4 °C) GBSS – Puffer befüllt und wurde während der gesamten Prozedur mit Carbogen begast. Von dem so vorbereiteten Gehirn wurden von rostral beginnend fortlaufende coronale Schnitte mit 500 µm

Schnittdicke angefertigt und diese mit einer sterilen feuerpolierten Glaspipette in Petrischalen mit gekühltem begastem GBSS – Puffer überführt. Die Frischgewebeschnitte wurden in den Petrischalen mit einer Pinzette unter einem Binokular fixiert und mit einer Augenschere die Regionen des MnPO und des OVLT herauspräpariert. Zur besseren Orientierung in den Schnitten dienten der dritte Hirnventrikel sowie die *Commissura anterior* als charakteristische Leitstrukturen (Abbildung 8). Die so gewonnen Exzidate wurden, getrennt nach Gehirngebieten, mit einer sterilen Glaspipette in Petrischalen mit gekühltem begastem HBSS – Puffer überführt. Nach der Präparation wurden die Exzidate unter der sterilen Arbeitsbank mit einer Pipette in die Dispase I Enzymlösung überführt, um die Zellen aus dem Gewebeverband zu lösen. Die Enzymlösung wurde in Aliquoten von 1 ml mit einer Konzentration von 2,4 U/ml angesetzt. Bei dem Transfer der Exzidate wurde zusätzlich die gleiche Menge an HBSS – Puffer hinzugegeben, sodass sich am Ende eine Konzentration des Enzyms von 1,2 U/ml ergab. In dieser Enzymlösung wurde das Gewebe unter ständiger Carbogenbegasung bei 37 °C für 40 min inkubiert. Der enzymatische Verdau der Zellen mit Dispase I wurde gewählt, da dieser zu keiner Schädigung der Zellmembran führt (Frangakis et al. 1982; Frangakis und Kimelberg 1984). Der enzymatische Verdau wurde durch zweimaliges Waschen mit der Inaktivierungslösung (HBSS – Puffer + EDTA) gestoppt, wonach das Gewebe noch dreimal mit dem Zellkulturmedium Neurobasal-A gewaschen wurde. Da der enzymatische Verdau den Gewebeverband nicht vollständig lösen konnte, wurde das Gewebe anschließend in 1 ml NBA durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren mit einer 1000 µl Pipette mechanisch dissoziiert. Mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer wurde die Zellzahl der Suspension ermittelt und durch Verdünnung mittels NBA auf eine Zellzahl von 75.000 Zellen / ml eingestellt. Die Suspension wurde auf die vorgewärmten Mikrozellkulturkammern verteilt (jeweils 350 µl) und zur Aufbewahrung in diesen in einen Inkubator mit 37 °C und CO₂-Konzentration von 5% überführt. Nach 24 h Stunden erfolgten eine erste Betrachtung der Zellen unter einem inversen Mikroskop, sowie ein erster Wechsel des Zellkulturmediums, wodurch tote Zellen und Zelldetritus aus der Suspension entfernt wurden. Nach weiteren zwei Tagen erfolgte ein erneuter Wechsel des Mediums. Nach einer 3 – 4 tägigen Wachstums- und Differenzierungsphase konnten die Zellen für Calcium-Imaging und Stimulationsversuche mit anschließender Zytokinmessung verwendet werden.

3.1.2. Etablierung einer primären neuroglialen Zellkultur der Spinalganglien (Dorsal Root Ganglion / DRG)

Wie bereits in der Einleitung dieses Abschnittes beschrieben, musste zur Untersuchung der Beeinflussung der peripheren Neurone des thermoregulatorischen Systems eine Primärzellkultur der Spinalganglien am Institut neu etabliert werden. Das erarbeitete Protokoll hierzu orientierte sich einerseits an den bereits erfolgreich etablierten Protokollen für Primärzellkulturen zentraler Gehirnregionen am Institut, andererseits an den gesammelten Erfahrungen anderer Arbeitsgruppen (D.3.1) und wurde an die Bedürfnisse dieser Arbeit angepasst.

3.1.2.1. Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
Neurobasal-A (NBA) Zellkulturmedium	Neurobasal-A Medium B 27 (Endkonzentration 2%) Penicillin/Streptomycin (100 µg/ml) L-Glutamin (2 mM)
GBSS – Puffer	GBSS Glucose (0,5%)
HBSS – Puffer	HBSS HEPES (20 mM)
DPBS – Puffer	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
Enzymlösung	HBSS – Puffer Collagenase Typ II (2,5 mg/ml) Dispase II (2,5 U/ml)
Inaktivierungslösung	HBSS – Puffer EDTA (1 mM)

3.1.2.2. Ablauf

Die Vorbereitungen für die Präparation der Spinalganglien glichen denen, die in Abschnitt D.3.1.1.2 für die Präparation der MnPO- und OVLT-Primärzellkulturen beschrieben wurden, das heißt auch hier wurden die flexiPERM Mikrozellkulturkammern, die für die Kultivierung der Zellen genutzt wurden, am Tag vor der eigentlichen Präparation vorbereitet und die benötigten Lösungen und Puffer am Tag der Präparation angesetzt.

Für die Präparation wurden Wistar-Ratten im Alter von 5 – 6 Wochen genutzt. Diese wurden mechanisch betäubt und durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend wurde, beginnend auf Höhe der *Scapula* bis zum *Os sacrum*, mittig auf dem Rücken ein Längsschnitt gesetzt, mit welchem die Haut und die Muskulatur durchtrennt wurden. Die Haut wurde stumpf abpräpariert und die Wirbelsäule zum einen am Übergang zwischen dem zervikalen und thorakalen, zum anderen am Übergang zwischen dem lumbalen und sakralen Bereich der Wirbelsäule mit einer Schere durchtrennt. Mit einem Skalpell wurde das Teilstück der Wirbelsäule von anhaftender Muskulatur gelöst und zum Transport in ein Becherglas mit gekühltem DPBS – Puffer überführt. Zur Präparation wurde die Wirbelsäule auf Zellstoff gelegt (Abbildung 9 A) und regelmäßig mit DPBS – Puffer angefeuchtet.

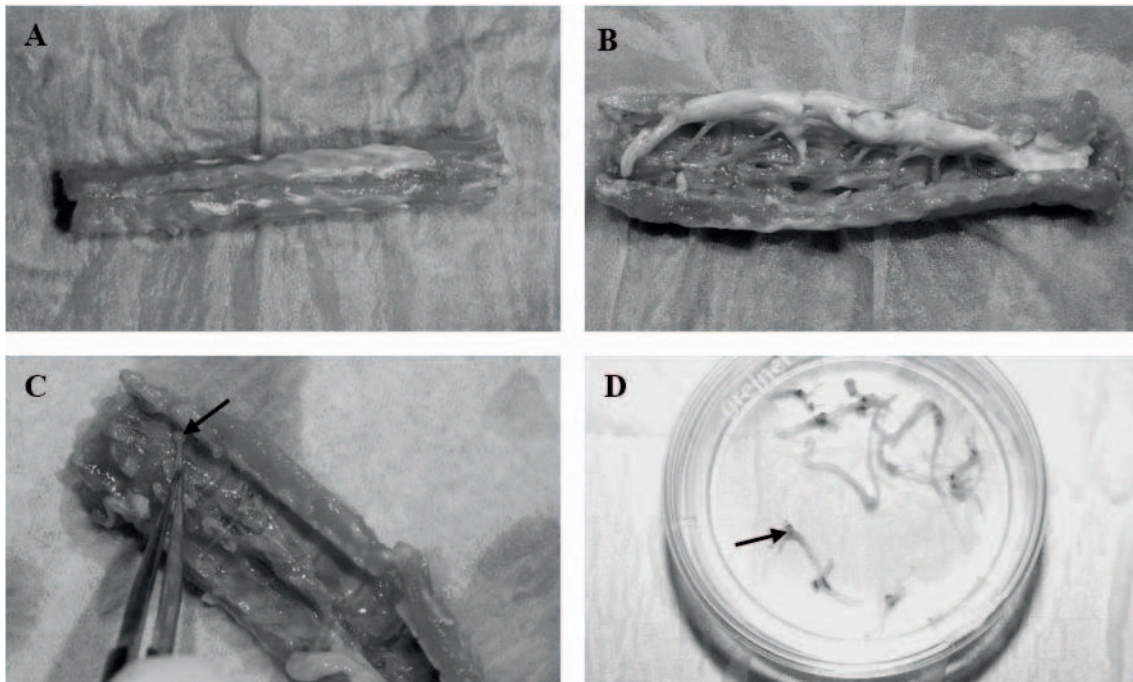


Abbildung 9: Lokalisation und Präparation der Spinalganglien

Das präparierte Teilstück der Wirbelsäule einer 5 Wochen alten Wistar-Ratte vor (A) und nach (B) Eröffnung des zentralen Wirbelkanals. Im Bereich der Zwischenwirbellöcher finden sich die Ganglien der paarigen Spinalnerven (B, C schwarzer Pfeil). Die präparierten Spinalganglien mit anhaftenden Spinalnerven in GBSS – Puffer (D schwarzer Pfeil).

Als erster Schritt wurde mit dem Schenkel einer Irisschere in den *Canalis vertebralis* eingedrungen und das Wirbelsäulenpräparat auf der dorsalen Seite vorsichtig der Länge nach eröffnet. Mit Hilfe zweier Pinzetten konnten die durchtrennten Wirbelkörper seitlich weggeklappt und das im *Canalis vertebralis* liegende Rückenmark freigelegt werden. Die zu präparierenden Nervenknotten der Spinalnerven lagen in den *Foramina intervertebralia*, den Austrittsstellen der paarigen segmentalen Spinalnerven aus dem *Canalis vertebralis*. Mit einer Pinzette wurde das Rückenmark vorsichtig angehoben und der Verlauf der Spinalnerven dargestellt (Abbildung 9 B). Mit einer Pinzette wurden die Spinalganglien durch leichten Zug vorsichtig aus dem *Foramen intervertebrale* gelöst (Abbildung 9 C) und mitsamt anhaftender Reste der Spinalnerven in eine Petrischale mit gekühltem begastem GBSS – Puffer überführt (Abbildung 9 D).

Die so gewonnen Spinalganglien wurden mit Hilfe einer Pinzette unter einem Binokular in der Petrischale fixiert. Mit einer zweiten Pinzette wurde die kollagenfaserige Kapsel, welche das Ganglion umschließt, vorsichtig entfernt und mit einer Augenschere die noch anhaftenden Reste der Spinalnerven direkt am Ganglion abgetrennt. Die Ganglien wurden mit einer sterilen Glaspipette in eine Petrischale mit gekühltem begastem HBSS – Puffer

überführt und zur Unterstützung des enzymatischen Verdaus mit einer Augenschere in zwei bis drei kleinere Stücke zerteilt. Diese wurden anschließend unter der sterilen Arbeitsbank mit einer Pipette in die Enzymlösung überführt. Unter der Vielzahl der möglichen nutzbaren Enzyme wurde eine Mischung aus Collagenase Typ II und Dispase II gewählt, da diese bereits erfolgreich eingesetzt wurde (Malin et al. 2007) und, wie auch bei dem enzymatischen Verdau des MnPO- und OVLT-Gewebes, den Vorteil bot, dass der Zellverband gelockert, die Zellmembran jedoch nicht vorgeschädigt wurde. Die Exzidate wurden für 45 min bei 37 °C und ständiger Carbogenbegasung inkubiert. Nach Ablauf der 45 min wurden die Exzidate unter der sterilen Arbeitsbank durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren mit einer 1000 µl Pipette vorsichtig dissoziiert und erneut für 1 min bei 37 °C und ständiger Carbogenbegasung inkubiert. Zur Beendigung des enzymatischen Verdaus wurden der Suspension 5 ml der Inaktivierungslösung hinzugegeben und die Suspension anschließend für 2 min bei 2000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Pellet in 5 ml Inaktivierungslösung resuspendiert und die Suspension erneut zentrifugiert. Nach der Inaktivierung folgten zwei Wasch- und Zentrifugationsschritte mit jeweils 5 ml NBA Zellkulturmedium. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Pellet in 1 ml NBA resuspendiert und mit Hilfe einer Neubauer Zellkammer die Zellzahl der Suspension ermittelt. Durch Zugabe von NBA wurde die Zellzahl auf 50.000 Zellen / ml eingestellt. Die Suspension wurde auf die vorgewärmten Mikrozellkulturkammern verteilt (jeweils 350 µl) und zur Aufbewahrung in diesen in einen Inkubator mit 37 °C und CO₂-Konzentration von 5% überführt. Bereits nach 6 h Stunden erfolgten eine erste Betrachtung der Zellen unter einem inversen Mikroskop, sowie ein erster Wechsel des Zellkulturmediums, wodurch tote Zellen und Zelldetritus aus der Suspension entfernt wurden. Ein erneuter Wechsel des Zellkulturmediums erfolgte nach 16 h. Im Anschluss an diesen Wechsel konnten die Zellen für Calcium-Imaging Versuche verwendet werden.

3.2. Ca^{2+} -Ratio Imaging Technik: Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration

Von der Kontrolle der Kontraktion der Herzmuskelzellen (Dulhunty 2006), über die Regulation wichtiger Aspekte des Zellzyklus (Lu und Means 1993), bis hin zur präsynaptischen calciumabhängigen Exozytose synaptischer Vesikel zur Freisetzung verschiedener Neurotransmitter (Neher und Sakaba 2008), Calcium spielt eine bedeutende Rolle in einer Vielzahl von Zellarten und physiologischen Prozessen (Berridge et al. 2000). So ist Calcium in neuronalen Zellen als intrazellulärer *second messenger* von essentieller Bedeutung. Neurone im Ruhezustand weisen eine intrazelluläre Calciumkonzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ von 50 – 100 nM auf, welche im Zuge elektrischer Aktivität vorübergehend auf das zehnfache bis hundertfache ansteigen kann (Berridge et al. 2000). Zur Untersuchung der Beeinflussung der Transmitter-induzierten intrazellulären Signaltransduktion durch PGE_2 und PGD_2 in einzelnen Neuronen und Gliazellen wurde im Zuge dieser Arbeit die Ca^{2+} -Ratio Imaging Technik genutzt, welche im Folgenden beschrieben wird.

3.2.1. Grundlagen der Ca^{2+} -Ratio Imaging Technik

Mit Hilfe der Ratio Imaging Technik steht der Wissenschaft eine effiziente Methode zur Messung von Konzentrationen freier intrazellulärer Ionen, wie zum Beispiel Ca^{2+} , zur Verfügung (Baylor und Hollingworth 2000; Hinman und Sammak 1998). Sie bietet damit die Möglichkeit, die Transmitter-induzierte intrazelluläre Signaltransduktion, sowie deren Beeinflussung durch Modulatoren, in Neuronen und Gliazellen zu studieren (Gebke et al. 2000; Hatzelmann et al. 2013; Jurzak et al. 1995; Ott et al. 2010; Ott et al. 2012; Wuchert et al. 2008; Wuchert et al. 2009).

Die Basis für die Messung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ bilden Fluoreszenzfarbstoffe, die in der Lage sind freies Ca^{2+} zu binden. Hier gibt es heutzutage eine große Auswahl an möglichen Indikatoren. Zum einen gibt es die klassischen chemischen Ca^{2+} -Indikatoren wie z.B. Fluo-3, Rhod-2, Quin-2, Indo-1 oder Fura-2 (Grynkiewicz et al. 1985), zum anderen gibt es die moderneren genetisch kodierten Indikatoren wie z.B. Camgaroo 2, Yellow

Cameleon 3.6 oder TN-XL. Die chemischen Indikatoren werden in zwei Gruppen unterteilt, die der wellenlängenstabilen und die der wellenlängenändernden (Paredes et al. 2008). Die wellenlängenstabilen Indikatoren, wie z.B. Fluo-3 oder Rhod-2, ändern nach Bindung von Calcium proportional ihre Emissionsintensität bei konstanten Exzitations- und Emissionsspektren. Die wellenlängenändernden Indikatoren, welche auch ratiometrisch genannt werden, hingegen ändern nach Bindung von Calcium ihre maximalen Exzitations- und Emissionsspektren (Paredes et al. 2008; Poenie und Tsien 1986). Der wohl bekannteste und am häufigsten eingesetzte Vertreter dieser Gruppe ist das Fura-2, welches auch im Rahmen dieser Arbeit genutzt wurde.

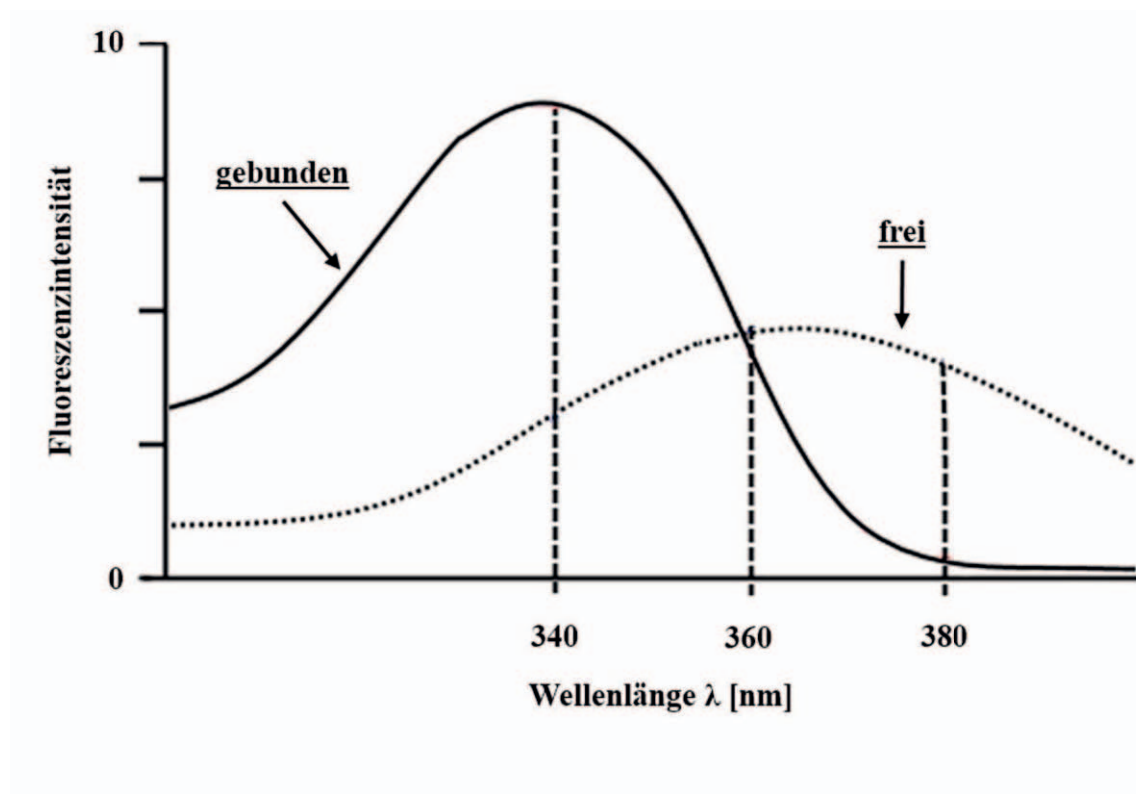


Abbildung 10: Exzitationsspektrum von Fura-2

Darstellung des Exzitationsspektrums von $1 \mu\text{M}$ Fura-2 bei einer Anregungswellenlänge von 500 nm . Die zur Messung genutzten Anregungswellenlängen von 340 nm für gebundenes und 380 nm für freies Fura-2 sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet. Isoemissiver Punkt bei 360 nm . (Modifiziert nach Grynkiewicz et al. 1985)

Fura-2 ist ein relativ hydrophobes Molekül, was die Permeation der Zellmembran lebender Zellen erschwert. Aus diesem Grund wird oft das Acetoxymethylester-Derivat Fura-2 AM verwendet. Dieses amphiphile Molekül kann die Zellmembran einfacher permeieren um intrazelluläres Calcium zu binden. Nachdem es die Zellmembran permeiert hat, wird die AM-Gruppe durch intrazelluläre Esterasen abgespalten und damit

eine erneute Permeation des Fura-2 aus der Zelle verhindert. Calciumfreies Fura-2 hat ein Exzitationsmaximum von 363 nm, wohingegen das Exzitationsmaximum von calciumgebundenem Fura-2 bei 335 nm liegt (Abbildung 10). Mit etwa 510 nm bleibt das Emissionsmaximum beider Isoformen relativ konstant (calciumfrei: 512 nm, calciumgebunden: 505 nm). In der praktischen Anwendung, wie auch in dieser Arbeit, wurden für Fura-2 Anregungswellenlängen (ARW) von 340 nm für die calciumgebundene und 380 nm für die calciumfreie Form gewählt. Die Abweichung zwischen der optimalen ARW von 363 nm und der gewählten ARW von 380 nm für die calciumfreie Form ist der Tatsache geschuldet, dass der isoemissive Punkt mit 358 nm sehr nah an der optimalen ARW liegt. An diesem Punkt führt eine Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ zu keiner Änderung der Emissionsintensität (Abbildung 10) (Malgaroli et al. 1987). Aus den gemessenen Emissionsintensitäten bei einer ARW von 340 nm und 380 nm wird der Quotient $[340 \text{ nm} / 380 \text{ nm}]$ gebildet. Durch die Nutzung zweier unterschiedlicher Anregungswellenlängen für Fura-2 und anschließender Ratio-Bildung der gemessenen Emissionsintensitäten lassen sich einige die Messung beeinflussende Faktoren minimieren, da beide Messungen gleichermaßen betroffen sein sollten. Solche Faktoren können z.B. eine unterschiedliche Zelldicke, eine ungleichmäßige intrazelluläre Verteilung des Farbstoffes oder Ausbleicheffekte (photo bleaching) sein. Gemäß des Massewirkungsgesetzes verhalten sich die so ermittelten Ratiowerte proportional zur absoluten $[Ca^{2+}]_i$, welche mit der folgenden Gleichung (Grynkiewicz et al. 1985) ermittelt werden kann:

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \times \frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} \times \frac{S_{f2}}{S_{b2}}$$

Formellegende:

$[Ca^{2+}]_i$ = absolute intrazelluläre Calciumkonzentration

K_d = Dissoziationskonstante von Fura-2 für Calcium (145 nmol/l)

R = Ratio der Emissionsintensitäten bei 340 nm und 380 nm

R_{min} = Ratio von Fura-2 in calciumfreier Lösung

R_{max} = Ratio von Fura-2 in calciumgesättigter Lösung

S_{f2} = Proportionalitätskoeffizient von calciumfreiem Fura-2 bei 380 nm

S_{b2} = Proportionalitätskoeffizient von calciumgesättigtem Fura-2 bei 380 nm

Im Rahmen dieser Arbeit wurde nicht die $[Ca^{2+}]_i$ ermittelt, sondern die Änderungen der Ratio (Δ Ratio) als Nachweis einer zelluläre Reaktion genutzt.

3.2.2. Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
Ca ²⁺ -Messpuffer, pH 7,4	<i>Aqua bidest.</i> 5 mM Na-HEPES, 130 mM NaCl, 10 mM Glucose, 5 mM KCl, 1 mM MgCl ₂ , 1,25 mM CaCl ₂
kaliumreicher Ca ²⁺ -Messpuffer, pH 7,4	<i>Aqua bidest.</i> 5 mM Na-HEPES, 85 mM NaCl, 10 mM Glucose, 50 mM KCl, 1 mM MgCl ₂ , 1,25 mM CaCl ₂
Fura-2AM – Stock	DMSO 1 mM Fura-2AM
Fura-2AM – Gebrauch	NBA – Medium 2 µM Fura-2AM Stocklösung (Verdünnung 1 : 500)
PBS – Puffer, pH 7,4	PBS – Tabletten in <i>Aqua bidest.</i> (1 Tablette / 200 ml)
Capsaicin – Stock	DMSO 10 mM Capsaicin
L-Glutamat – Stock	<i>Aqua bidest.</i> 100 mM L-Glutamat
Menthol – Stock	abs. ETOH 100 mM Menthol
PGD ₂ – Stock	PBS – Puffer 1 mM PGD ₂
PGE ₂ – Stock	PBS – Puffer 1 mM PGE ₂

3.2.3. Messstand

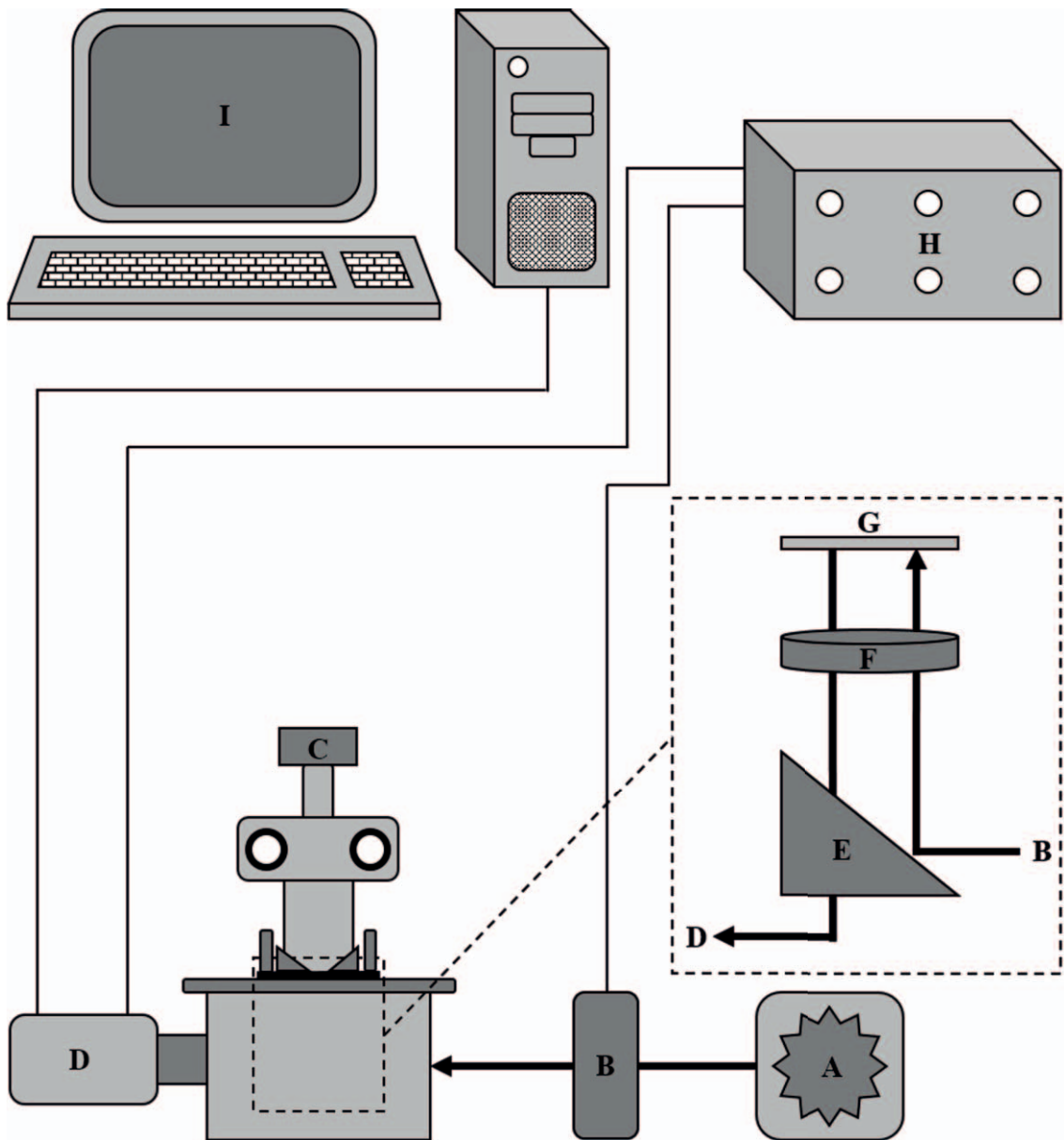


Abbildung 11: Schematischer Aufbau des Ca^{2+} -Imaging Messstandes
 Quecksilberdampflampe(A), Filterradd mit Filtern für 340 / 380 nm und elektronisch regulierbarem Shutter (B), Inversmikroskop (C), Kamera (D), dichromatischer Spiegel (E), Fluoreszenzobjektiv (F), Deckgläschen (G), Steuereinheit (H), Computer (I)

Der für die Ca^{2+} -Ratio Imaging Versuche genutzte Messstand nutzte eine Quecksilberdampflampe als Lichtquelle (Abbildung 11 A). Das Licht dieser Lampe wurde durch ein Filterradd mit Filtern für 340 nm und 380 nm geleitet, welche durch einen elektronisch geregelten Shutter verschlossen werden konnten (Abbildung 11 B), und gelangte daraufhin in ein Inversmikroskop (Abbildung 11 C). Dort wurde das gefilterte,

monochromatisches Licht über einen dichromatischen Spiegel (Abbildung 11 E) durch ein Fluoreszenzobjektiv (Abbildung 11 F) in die Messkammer geleitet. Die Messkammer selbst bestand aus einer Stahlscheibe mit einer kreisförmigen Öffnung (\varnothing 1 cm) in der Mitte. Über dieser Öffnung wurde das CELL-VU Glas mit den anhaftenden Zellen angebracht und bildete somit den Boden der Messkammer. Zur Befestigung wurde das Deckglas mittels eines Teflonringes, welcher die Wand der Messkammer bildete, auf der Stahlscheibe fixiert. Zur ständigen Superfusion der Zellen mit Messpuffer wurden ein Zu- und ein Ablauf an der Messkammer angebracht (Abbildung 12). Das in die Messkammer abwechselnd eingeleitete Licht beider Wellenlängen regte das intrazelluläre Fura-2 zur Lichtemission an, welches wieder durch das Fluoreszenzobjektiv und einen 515 nm-Sperrfilter auf den dichromatischen Spiegel und letztendlich in eine 14-bit-CCD-Restlichtkamera (Abbildung 11 D) geleitet wurde. Zur Dokumentation der Messung und Ermittlung der Ratiowerte [340 nm / 380 nm] wurde die Software Metafluor eingesetzt, mit welcher auch das Filtrerrad und der Shutter, und somit die genutzte Wellenlänge, die Belichtungszeit und der Abstand zwischen zwei Messpunkten gesteuert werden konnten.

3.2.4. Versuchsvorbereitung

Die kultivierten Zellen der verschiedenen Regionen wurden nach unterschiedlicher Dauer (1 – 2 Tage nach Präparation bei DRG – Kulturen, 3 – 4 Tage nach Präparation bei MnPO und OVL – Kulturen) für die Ca^{2+} -Ratio Imaging Versuche eingesetzt. Hierzu wurden die Primärkulturen mit der Fura-2AM – Gebrauchslösung für 40 min bei 37 °C und 5% CO_2 lichtgeschützt im Brutschrank inkubiert. Die so mit Fura-2 beladenen Zellen wurden nach der Inkubation zum Messstand überführt und in diesen eingebaut. Hierzu musste zuerst die Fura-2 Gebrauchslösung entfernt und das CELL-VU Glas vorsichtig von der flexiPERM Mikrozellkulturkammer gelöst werden. Anschließend wurde das CELL-VU Glas mit Hilfe des Teflonringes auf der Stahlscheibe fixiert und somit die Messkammer gebildet (Abbildung 12). Diese wurde in eine entsprechende Öffnung des Objektisches am Inversmikroskop eingesetzt und Zu- und Ablauf, bestehend aus zwei gebogenen Kanülen, an der Messkammer angebracht. Mit Hilfe der Schlauchpumpe wurde sofort mit der Superfusion der Zellen mit Messpuffer mit einer Flussrate von 2 ml / min begonnen, um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern. Je nach Versuchsprotokoll hatte der

Messpuffer Raumtemperatur oder 37 °C (siehe Versuchsprotokolle). Die Superfusion mit Messpuffer wurde während der Versuchsdurchführung durchgehend gewährleistet, wodurch ein stetiger Pufferwechsel und eine fortwährende Füllung der Messkammer mit 1 ml Flüssigkeit gesichert wurden. Über eine der Schlauchpumpe vorgeschaltete Hahnbank konnten die zu untersuchenden Substanzen in das Superfusionssystem eingespeist werden. Zusätzlich konnte der Messpuffer über ein elektrisch regulierbares Peltier-Element erwärmt werden (Abbildung 12).

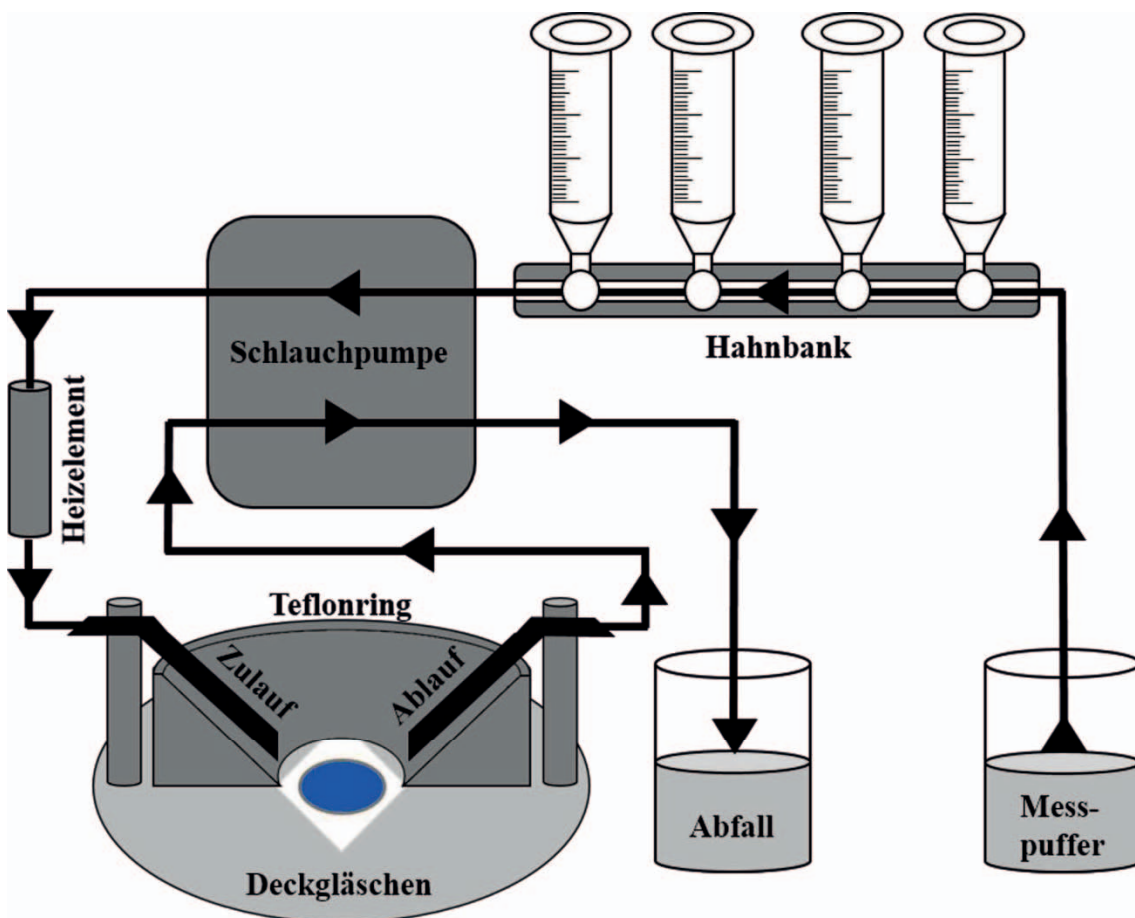


Abbildung 12: Schematischer Aufbau des Superfusions-Systems
(Modifiziert nach Hatzelmann 2012)

3.2.5. Versuchsdurchführung

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen wurden Zellen aus mehreren Präparationen benutzt, um präparations- und wurfbedingte Einflüsse auf die Messungen zu minimieren. So wurden die Messungen an Primärkulturen des MnPO und des OVLT an 83 (MnPO) bzw. 72 (OVLT) Wells aus insgesamt 19 Präparationen durchgeführt. Die Messungen an primären Spinalganglienkulturen wurden an 27 Wells aus 8 Präparationen durchgeführt. Die zur Superfusion genutzten Konzentrationen für Glutamat und PGE₂ (10⁻⁵ M) wurden bereits in der Vergangenheit am Institut durch Superfusion von neuroglialen Primärkulturen mit Konzentrationsreihen ermittelt (unveröffentlichte Daten) und im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt. Die verwendete Konzentration für die Superfusion von primären Spinalganglienkulturen mit Methanol (10⁻⁴ M) basiert auf Arbeiten von Gordon Reid und Alexandru Babes (Reid et al. 2002). Die Ca²⁺-Ratio Imaging Versuche an MnPO- und an OVLT-angereicherten Primärkulturen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt, da eigene Vorversuche zeigten haben, dass die zellulären Reaktionen sich im Vergleich zu Messungen mit erwärmtem Messpuffer (37 °C) nicht signifikant unterschieden. Die Versuche mit Spinalganglienkulturen wurden bei Körpertemperatur (37 °C) durchgeführt.

Vor der eigentlichen Messung musste der Erfolg der Inkubation der Zellen mit Fura-2 am Mikroskop kontrolliert werden. Anschließend musste eine zur Messung geeignete Region auf dem Deckglas gesucht werden. Hierbei wurde darauf geachtet, dass möglichst viele einzeln liegende Zellen (Neurone, Astrozyten und Mikrogliazellen) im Messbereich zu sehen waren, wodurch eine indirekte Stimulation durch direkte Zellinteraktionen während der Messung minimiert wurde. Nach Auswahl einer entsprechenden Region wurden die zu messenden Zellen in der Software Metafluor als *regions of interest* (ROIs) markiert und fortlaufend nummeriert. Hierdurch konnten die gewonnen Messwerte direkt den einzelnen Zellen zugeordnet werden.

Vor der ersten Zugabe einer der zu untersuchenden Substanzen in das Superfusionssystem wurden die Zellen für 5 – 10 Minuten mit Messpuffer superfundiert und somit nicht in die Zellen permeiertes Fura-2 AM aus der Messkammer ausgespült. Anschließend wurde mit der eigentlichen Messung begonnen. Zur Messung der Ratio-Werte wurde das Licht der Quecksilberdampflampe durch die Filter des Shutterrades

geleitet und die Zellen bei 340 nm und 380 nm beleuchtet, wobei die Belichtungszeiten bei 340 nm 70 ms und bei 380 nm 35 ms betrugen. Der Abstand zwischen zwei Messpunkten betrug 4 s während einer Stimulation und 8 s während einer Regenerationsphase, wodurch Ausbleicheffekte minimiert wurden. Die ermittelten Werte wurden durch die Software grafisch dargestellt. Zu Beginn einer Messung wurden die Ratiowerte während der Superfusion mit Ca^{2+} -Messpuffer aufgezeichnet. Erst wenn sich hierbei eine stabile Basislinie zeigte, wurde mit der ersten Stimulation begonnen. Die zu untersuchenden Substanzen, welche bis zu diesem Zeitpunkt auf Eis gelagert wurden, wurden zu Beginn des Versuches in Ca^{2+} -Messpuffer auf ihre Endkonzentration verdünnt und konnten durch Drei-Wege-Hähne an der Hahnbank in das Superfusionssystemeingeleitet werden (Abbildung 12). Während einer Stimulation wurden die Zellen für 3 min mit substanzhaltigem Messpuffer superfundiert. Anschließend folgte eine Regenerationsphase von 6 min, während dieser die Zellen mit Messpuffer superfundiert wurden. Daraufhin folgte eine zweite Stimulation, gefolgt von einer zweiten Regenerationsphase. So wechselten sich Stimulation und Regeneration bis zu einem Maximum von 5 Stimulationen ab (Abbildung 13). Den Abschluss einer Messung bildete eine Stimulation mit kaliumreichem Messpuffer, welche zur Kontrolle der Vitalität der gemessenen Neurone, und damit auch einer besseren Unterscheidung von Neuronen, Astrozyten und Mikrogliazellen, diente. Das in dem Messpuffer enthaltene KCl führte bei intakten Neuronen zu einer starken Depolarisation und einem damit verbundenem Einstrom von Calcium in die Zellen, welcher sich grafisch als starkes Signal darstellte.

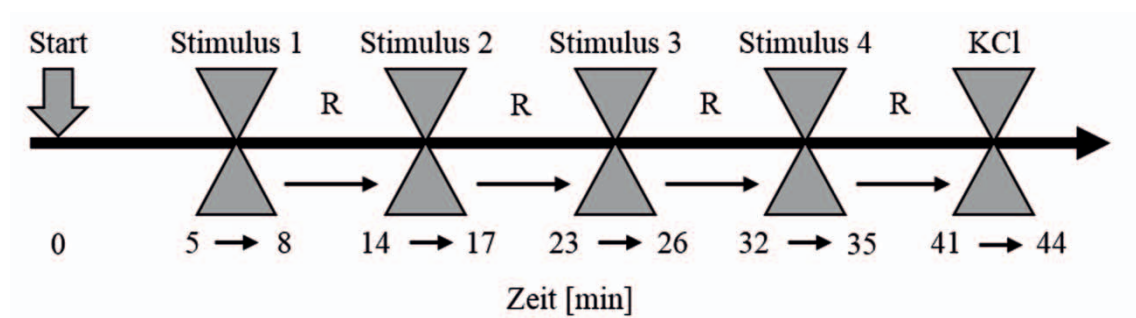


Abbildung 13: Modellhafte Darstellung der zeitlichen Abläufe eines Ca^{2+} -Ratio Imaging Messprotokolls

In allen durchgeführten Ca^{2+} -Ratio Imaging Messungen folgten alternierend Stimulationen und Regenerationsphasen (R). Abschließend erfolgte eine Stimulation mit kaliumreichem Messpuffer (KCl).

In Vorbereitung für die anschließenden immunzytochemischen Untersuchungen wurden die Zellen nach erfolgter Messung für 15 Minuten in gekühltem (4 °C) PFA 4% fixiert und anschließend mit gekühltem PBS gewaschen. Die Zellen konnten für bis zu 2 Wochen bei 4 °C in PBS gelagert werden. Im Rahmen der immunzytochemischen Untersuchungen wurden die Zellen mit spezifischen Markern angefärbt und somit eine Zelltypenbestimmung durchgeführt (siehe 3.3).

3.2.6. Messprotokolle

3.2.6.1. Superfusionsstimulation der MnPO- und OVLT-Primärkulturen mit Glutamat und PGE₂

Mit diesen ersten Untersuchungen sollte ein möglicher modulatorischer Effekt des proinflammatorischen Prostaglandins E₂ (Coceani et al. 1988; Milton 1998; Milton und Wendlandt 1971) auf die Erregbarkeit von Neuronen, Astrozyten und Mikrogliazellen des MnPO und des OVLT untersucht werden. Weiterhin sollte eine mögliche direkte Responsivität dieser Zellen auf PGE₂ untersucht werden. Als Basis für die Untersuchung des modulatorischen Effektes dienten Stimulationen mit dem exzitatorischen Neurotransmitter Glutamat. Der Bedeutung von Glutamat als einem der wichtigsten exzitatorischen Neurotransmitter im zentralen Nervensystems ist man sich seit langem bewusst (Graham, Jr. et al. 1967), jedoch haben erst Untersuchungen in der nahen Vergangenheit gezeigt (Nakamura und Morrison 2008a), dass die Weiterleitung von Signalen kältesensitiver Neurone aus der Peripherie in das thermoregulatorische Zentrum des MnPO über glutamaterge Neurone erfolgt.

Das Kernstück zur Untersuchung eines modulatorischen Effektes von PGE₂ auf die Zellen des MnPO und des OVLT bildeten die drei aufeinanderfolgenden Stimulationen:

- Erste Stimulation mit Glutamat 10⁻⁵ M (Glut1)
- Stimulation mit Glutamat 10⁻⁵ M und PGE₂ 10⁻⁵ M (Glut + PGE₂)
- Zweite Stimulation mit Glutamat 10⁻⁵ M (Glut2)

Die Superfusion mit Glutamat führte an zahlreichen Neuronen und Astrozyten zu einer Erhöhung der [Ca²⁺]_i, welche als deutliche Änderung der Ca²⁺-Ratio verzeichnet wurde.

Durch die gleichzeitige Gabe von PGE_2 konnte nun untersucht werden, ob dessen Anwesenheit zu einer Modulation auf die durch Glutamat induzierte Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ führte. Eine zweite Superfusion mit Glutamat diente der Kontrolle einer möglichen Desensibilisierung der Zellen auf die wiederholte Stimulation mit Glutamat bzw. einer möglicherweise länger anhaltenden Modulation durch die vorherige Superfusion mit PGE_2 .

Zur Untersuchung der direkten Responsivität der Zellen auf PGE_2 wurden diese während der Messung zusätzlich mit PGE_2 10^{-5} M superfundiert. Diese Stimulation geschah alternierend vor der ersten oder nach der letzten Stimulation mit Glutamat. Hierdurch sollte untersucht werden, ob es in den betreffenden Hirnregionen Zellen gibt, die auf PGE_2 selbst mit einem Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ reagieren. Als fünfter Stimulus folgte, wie bereits in 3.2.5 beschrieben, eine Superfusion mit kaliumreichem Messpuffer. Wie bereits in Abbildung 13 dargestellt, wurden die Zellen jeweils für 3 Minuten mit den Substanzen superfundiert und zwischen jeder einzelnen Stimulation zur Regeneration für 6 Minuten mit Ca^{2+} -Messpuffer superfundiert. Diese Versuchsreihe wurde bei Raumtemperatur durchgeführt.

3.2.6.2. Repetitive Superfusionsstimulation der MnPO- und OVLT-Primärkulturen mit PGE_2

Ziel dieser Versuchsreihe war es, eine mögliche Desensibilisierung an Zellen des MnPO und des OVLT durch eine wiederholte Superfusionsstimulation mit PGE_2 zu untersuchen. Hierzu wurden die Primärkulturen für 3 Minuten mit PGE_2 10^{-5} M superfundiert, gefolgt von einer 6 minütigen Regenerationsphase. Dies wurde noch zweimal wiederholt, sodass die Zellen insgesamt dreimal mit PGE_2 superfundiert wurden. Eine finale Stimulation mit kaliumreichem Messpuffer diente auch hier der Vitalitätskontrolle. Diese Versuchsreihe wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Aufgrund der geringen Anzahl an direkt responsiven Zellen in den untersuchten Primärkulturen wurde diese Versuchsreihe nicht weiter ausgeführt.

3.2.6.3. Superfusionsstimulation der MnPO- und OVLT-Primärkulturen mit Glutamat und PGD₂

Ziel dieser Versuchsreihe war es, die Wirkung des thermoregulatorisch aktiven Prostaglandins D₂ an MnPO- und OVLT-Primärkulturen vergleichend zur Wirkung von PGE₂ zu untersuchen. Anders als das proinflammatorische PGE₂ gilt PGD₂ oftmals als antiinflammatorisch (Krall et al. 2010; Mouihate et al. 2004; Rajakariar et al. 2007; Ueno et al. 1982). Es gibt jedoch auch Untersuchungen, die einen proinflammatorischen Charakter von PGD₂ belegen (Förstermann et al. 1983; Gao et al. 2009a; Gao et al. 2009b).

Vor Beginn der eigentlichen Versuchsreihe wurden Dosis-Wirkungs-Untersuchungen an MnPO- und OVLT-Primärkulturen mit verschiedenen Konzentrationen an PGD₂ (10⁻⁶ und 10⁻⁵ M) durchgeführt. Aufgrund der geringen Anzahl an direkt responsiven Zellen wurden diese Untersuchungen jedoch nicht weiter ausgeführt und für alle weiteren Untersuchungen eine Konzentration von 10⁻⁵ M gewählt.

Analog zu den unter 3.2.6.1 durchgeführten Superfusionsstimulationen mit PGE₂ wurden in dieser Versuchsreihe Primärkulturen des MnPO und des OVLT mit PGD₂ superfundiert. Das Versuchsprotokoll glich dem unter 3.2.6.1 beschriebenen Protokoll, wobei PGE₂ 10⁻⁵ M durch PGD₂ 10⁻⁵ M ersetzt wurde. Die Superfusionsstimulation mit PGD₂ 10⁻⁵ M zur Untersuchung der direkten Responsivität wurde im Vergleich zu 3.2.6.1 nicht alternierend als erste oder vierte Stimulation, sondern immer als vierte durchgeführt. Als finale Stimulation wurden die Zellen mit kaliumreichem Messpuffer superfundiert. Auch diese Versuchsreihe wurde bei Raumtemperatur durchgeführt.

3.2.6.4. Repetitive Superfusionsstimulation der MnPO- und OVLT-Primärkulturen mit Glutamat

Bei dieser Versuchsreihe handelte es sich um einen Vorversuch für den späteren immunzytochemischen Nachweis GABAerger Neurone im MnPO und OVLT. Es sollte untersucht werden, ob der Nachweis des inhibitorischen Neurotransmitters GABA auch

nach mehrfacher Stimulation der Zellen mit Glutamat 10^{-5} M und KCl noch durchführbar ist oder ob es zu einer vollständigen Entleerung der intrazellulären Speicher kommt.

3.2.6.5. Superfusionsstimulation der DRG-Primärkulturen mit PGE₂, PGD₂ und Menthol

Wie bereits einleitend erwähnt, wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht nur neurogliale Primärkulturen aus zentralen, sondern auch aus peripheren Gebieten, genauer gesagt den Spinalganglien, untersucht. Die Spinalganglien enthalten im Regelkreis der Thermoregulation die Zellkörper Thermosensoren.

In dieser Versuchsreihe wurden kultivierte sensorische Neurone der Spinalganglien mit den Prostaglandinen E₂ und D₂ superfundiert und auf eine direkte Responsivität dieser Neurone auf die Prostaglandine sowie auf eine mögliche Modulation der zellulären Antworten auf PGE₂ durch die gleichzeitige Anwesenheit von PGD₂ hin untersucht. Weiterhin wurden die Zellen mit Menthol superfundiert, um eine direkte Responsivität auf dieses nachzuweisen. Menthol ist bekannt dafür, in kältesensitiven Neuronen zu einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ zu führen (Babes et al. 2004; Okazawa et al. 2000) und wird daher als Nachweis der peripheren Kältesensoren genutzt.

Für die Untersuchung der direkten Responsivität auf PGE₂ bzw. PGD₂ wurden die Zellen jeweils mit PGE₂ 10^{-5} M oder PGD₂ 10^{-5} M superfundiert. Weiterhin wurden die Zellen mit einem Gemisch aus PGE₂ 10^{-5} M und PGD₂ 10^{-5} M superfundiert, um einen modulatorischen Effekt von PGD₂ auf die zelluläre Reaktion durch PGE₂ hin zu untersuchen. Die Reihenfolge dieser drei Superfusionsstimulationen wurde in jeder Kultur verändert, sodass jeder Stimulus an erster, zweiter oder dritter Stelle des Protokolls erfolgen konnte. Hierdurch konnte eine mögliche Beeinflussung der getesteten Substanzen unter sich auf die zellulären Reaktionen untersucht werden. Als vierter Stimulus erfolgte immer eine Superfusion mit Menthol 10^{-4} M, gefolgt von einer abschließenden Superfusion mit kaliumreichem Messpuffer als Vitalitätskontrolle. Diese Versuchsreihe wurde bei 37 °C durchgeführt.

3.2.6.6. Superfusionsstimulation der MnPO- und OVLT-Primärkulturen mit Menthol und PGE₂

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, wird der MnPO als wichtigste zentrale Schaltstelle im Regelkreis der Thermoregulation angesehen, an welcher unter anderem Signale von peripheren Thermosensoren eintreffen. Mit dieser Versuchsreihe sollten nun Zellen des MnPO und des OVLT auf eine direkte Responsivität auf Menthol hin untersucht werden. Hierdurch sollte überprüft werden, ob im MnPO und OVLT Neurone nachweisbar sind, die analog zu den kältesensitiven sensorischen Neuronen der Spinalganglien, auch durch eine Stimulation mit Menthol aktiviert werden können. Weiterhin sollten Neurone, welche eine direkte zelluläre Antwort auf Menthol zeigen, mit PGE₂ stimuliert werden, um weitere Rückschlüsse über die Bedeutung der direkten Responsivität auf PGE₂ ziehen zu können. Aufgrund der nicht vorhandenen direkten Responsivität der untersuchten Zellen auf Menthol wurde diese Versuchsreihe jedoch nicht weiter ausgeführt.

3.2.7. Datenevaluierung und Statistik

Die von dem Programm Metafluor während der unterschiedlichen Versuchsreihen ermittelten Ratiowerte wurden für jede Zelle gespeichert und automatisch an Microsoft Excel übergeben. Hier wurde der Verlauf der Ratiowerte für jede Zelle zeitabhängig in einem Koordinatensystem graphisch dargestellt und ausgewertet. Für die Auswertung wurde die Änderung des Ratiowertes herangezogen, d.h. der Unterschied zwischen dem maximalen absoluten Ratiowert während einer Stimulation und dem während der vorhergehenden Regenerationsphase aufgezeichneten Basiswert. Um methodenbedingte Einflüsse und daraus resultierende marginale Änderungen der Ratiowerte zu minimieren, wurden nur Ratio-Änderungen ($\Delta\text{Ratio} \geq 0,05$) berücksichtigt. Weiterhin wurden Zellen aus der Auswertung ausgeschlossen, die während des Versuchs keine stabile Basislinie zeigten oder nach einer Stimulation nicht wieder zu dieser zurückkehrten. Auch wurden Neurone ausgeschlossen, die nicht auf den finalen Stimulus mit kaliumreichem Messpuffer reagierten. Dies diente dazu, möglicherweise nicht mehr vitale Zellen nicht mit in die Auswertung einfließen zu lassen.

Je nach Antwortverhalten und verwendetem Messprotokoll wurden die Zellen im Rahmen der Auswertung in verschiedene Gruppen eingeteilt. Die ausgewerteten Zellen der Superfusionsstimulationsversuche mit PGE₂ und PGD₂ an Zellen des MnPO und des OVL (3.2.6.1 und 3.2.6.3) wurden in drei Gruppen unterteilt, wobei das Antwortverhalten der Zellen auf die gleichzeitige Stimulation mit Glutamat und PGE₂ bzw. PGD₂ (Glut + PGE₂ bzw. PGD₂) im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit Glutamat (Glut1 / Glut2) die Einteilung bestimmte. Diese Gruppen waren:

- keine Modulation des Antwortsignals
- Modulation mit einer Verstärkung des Antwortsignals
- Modulation mit einer Abschwächung des Antwortsignals

Zusätzlich wurden die Zellen anhand ihrer direkten Responsivität auf eine Stimulation mit PGE₂ bzw. PGD₂ bewertet. Hierbei wurde zwischen responsiven und nicht responsiven Zellen unterschieden.

Die Auswertung der Superfusionsstimulationsversuche an Primärkulturen der Spinalganglien fand nach anderen Kriterien statt. Die Zellen wurden zum einen anhand ihrer direkten Responsivität auf PGE₂ und Menthol in responsive und nicht responsive Zellen unterteilt, zum anderen fand ein Vergleich des Antwortverhaltens auf die alleinige Stimulation mit PGE₂ (PGE₂) im Vergleich zur gleichzeitigen Stimulation mit PGD₂ (PGE₂ + PGD₂) statt. Nach diesem Vergleich wurden die Zellen in drei Gruppen unterteilt:

- keine Modulation des Antwortsignals
- Modulation mit einer Verstärkung des Antwortsignals
- Modulation mit einer Abschwächung des Antwortsignals

Zusätzlich zu den Unterteilungen gemäß ihres Antwortverhaltens wurden die untersuchten Neurone der Spinalganglien auch anhand ihrer Größe eingeteilt, da die unterschiedlich großen Neurone unterschiedliche physiologische Funktionen übernehmen (Castillo et al. 2011; Hanani 2005). Es wurden kleine Neurone mit etwa 15 µm, mittelgroße Neurone mit etwa 35 µm und große Neurone etwa 55 µm Durchmesser unterschieden.

Die nach dieser Auswertung erhaltenen Daten wurden zur statistischen Analyse und graphischen Darstellung in die Software GraphPad Prism exportiert. Für die jeweiligen Gruppen der verschiedenen Messprotokolle wurden aus den ermittelten Ratio-Änderungen die arithmetischen Mittelwerte (MW) \pm Standardfehler der Mittelwerte (SEM) errechnet. Für die weitere Auswertung der Versuche nach 3.2.6.1 und 3.2.6.3 wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit dem Newman-Keuls Post-hoc Test zur Analyse der statistischen Signifikanz durchgeführt. Für die statistische Auswertung der Gruppen aus den Versuchen nach 3.2.6.5 wurden abhängige und unabhängige t-Tests durchgeführt. Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Ratio-Änderungen der einzelnen Versuche mit einem $p \leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant erachtet.

3.3. Immunzytochemie

3.3.1. Grundlagen der Immunzytochemie

Die Interaktion der Antigenbindungsstellen (Paratope) spezifischer Antikörper mit den Bindungsstellen antigener Strukturen (Epitope) stellt die Grundlage der Immunzytochemie dar. Der hierbei entstehende Antigen-Antikörper-Komplex kann mikroskopisch detektiert und somit die antigene Struktur nachgewiesen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden mono- und polyklonale Antikörper der Klasse IgG verwendet.

Für diese Arbeit wurde die indirekte Immunfluoreszenz zum Nachweis der Antigen-Antikörper-Komplexe gewählt (Coons 1958). Hierbei wird zuerst ein spezifischer primärer Antikörper eingesetzt, welcher gegen das gesuchte Antigen gerichtet ist. In einem zweiten Schritt wird ein sekundärer Antikörper verwendet, welcher gegen den primären Antikörper gerichtet ist. Dieser Sekundärantikörper ist zusätzlich mit einem Fluorophor gekoppelt, welches durch Exzitation mit Licht einer geeigneten Wellenlänge (300 – 550 nm) seinerseits zur Lichtemission angeregt wird und somit der Detektion der Antigen-Antikörper-Komplexe dient (Abbildung 14).

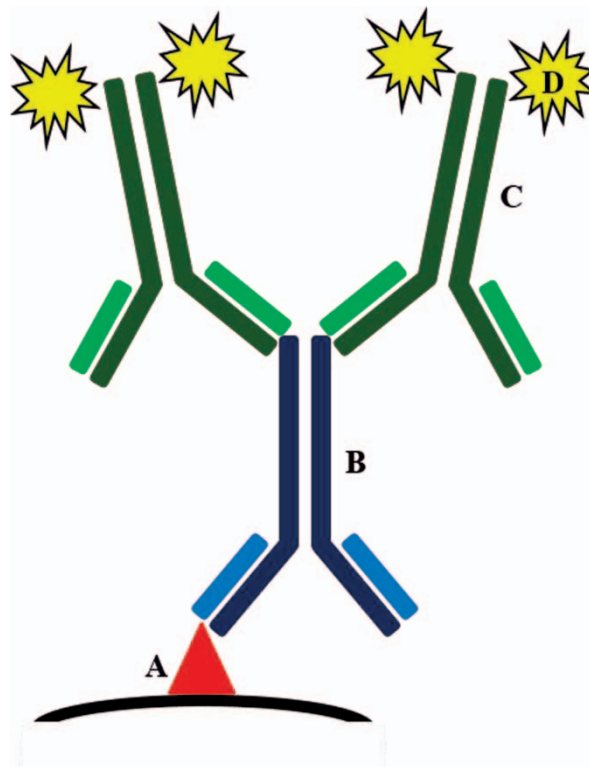


Abbildung 14: Schematische Darstellung der indirekten Immunfluoreszenz

Der Primärantikörper (B) bindet mit seinem Paratop an das Epitop des Antigens (A). Daraufhin bindet der Sekundärantikörper (C) mit den gekoppelten Fluorophoren (D) seinerseits an den Primärantikörper.

Diese Methode bietet eine hohe Sensitivität, jedoch bleichen die Fluorophore durch die Exzitation relativ schnell aus. Ein weiterer Vorteil liegt in der Verwendung mehrerer Primärantikörper aus verschiedenen Tierspezies mit den entsprechenden Sekundärantikörpern. Durch solche Doppel- oder Dreifachmarkierung können zeitgleich mehrere antigene Strukturen nachgewiesen werden.

Neben der Markierung mit Antikörpern wurden die untersuchten Zellen zusätzlich mit 4',6-Diamidin-2-Phenylindol Dilaktat (DAPI) markiert. Dieser Fluoreszenzfarbstoff lagert sich in DNA und RNA ein und dient der unspezifischen Markierung von Zellkernen.

3.3.2. Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
DAPI – Inkubationslösung	DAPI 1:1000 in PBS
Inkubationspuffer (Block – Lösung)	10% FKS in PBS-T
Paraformaldehyd – Lösung (PFA) 4%	PFA (Pulverform) in PBS, unter Rühren bei 60 °C; Filtration mit Faltenfilter (Ø 240 mm); auf Eis abkühlen
PBS – Puffer, pH 7,4	PBS – Tabletten in <i>Aqua bidest.</i> (1 Tablette / 200 ml)
PBS-T	PBS unter Zugabe von 0,05% Triton-X-100

3.3.3. Antikörper

3.3.3.1. Primärantikörper

Antigen	Spezies	Verdünnung	Katalog-Nr. / Hersteller
CD68 (ED1)	Mouse	1:1000	MCA341R; AbD seroTec, D-Düsseldorf
GABA	Rabbit	1:2000	A2052; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
GAD-65/67 (C20)	Goat	1:100	sc-7513; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
GFAP	Mouse	1:1500	MAB3402; Merck KGaA, D-Darmstadt
	Rabbit	1:1000	Z0334; DakoCytomation, D-Eching
MAP (2a+2b)	Mouse	1:1500	M1406; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Zur eindeutigen Bestimmung der Zellphänotypen der im Rahmen der Ca²⁺-Ratio Imaging Versuche untersuchten Zellen wurden immunzytochemische Doppelmarkierungen vorgenommen. Hierbei wurden Antikörper zur Markierung verschiedener Zellmarkerproteine eingesetzt. Zur Darstellung von Neuronen wurde ein Antikörper

gegen das *microtubule associated protein 2* (MAP 2a+2b) eingesetzt, welches hauptsächlich in Zellen neuronalen Ursprungs zu finden ist. Astrozyten wurden mittels eines Antikörpers gegen das *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) markiert, einem Hauptbestandteil des Zytoskeletts von Gliazellen. Mikrogliazellen wurden mit einem gegen das Oberflächenprotein CD (*cluster of differentiation*) 68 gerichteten Antikörper markiert (Graeber et al. 1989).

Neben der Markierung der Zellmarkerproteine zur Bestimmung der Zellphänotypen wurde auch ein Nachweis für den klassischen inhibitorischen Neurotransmitter GABA durchgeführt. Hierfür wurde zu Beginn ein Antikörper gegen die Enzyme Glutamat-Decarboxylase (GAD) 65 und 67 eingesetzt, welche eine entscheidende Rolle für die Synthese von GABA spielen, und später ein Antikörper, welcher direkt an den Neurotransmitter binden konnte.

3.3.3.2. Sekundärantikörper

Die Sekundärantikörper wurden in Konzentrationen von 1:500 (Alexa Fluor® 488) bzw. 1:1000 (CyTM3) verwendet.

Name	aus Spezies	gegen Spezies	Katalog-Nr. / Hersteller
Alexa Fluor® 488	Donkey	Goat	A-11055; Life Technologies GmbH, D-Darmstadt
		Mouse	A-21202; Life Technologies GmbH, D-Darmstadt
		Rabbit	A-21206; Life Technologies GmbH, D-Darmstadt
Cy TM 3	Goat	Mouse	115-165-003; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA
	Donkey	Goat	705-165-147; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA

Cy TM 3	Donkey	Rabbit	711-165-152; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA
--------------------	--------	--------	---

3.3.3.3. Kontrollen

Für die Bestimmung des Zellphänotyps in den Primärkulturen des MnPO, OVLT und DRG unter Einsatz der Primärantikörper MAP (2a+2b), GFAP und CD68 wurden keine Kontrollen durchgeführt, da diese bereits seit langem erfolgreich im Institut verwendet werden (Ott et al. 2010; Ott et al. 2012; Wuchert et al. 2008; Wuchert et al. 2009).

Für den Nachweis des Neurotransmitters GABA wurden Kontrollen ohne Anwesenheit eines Primärantikörpers durchgeführt. Hierdurch konnte eine unspezifische Bindung der verwendeten Sekundärantikörper ausgeschlossen werden.

3.3.4. Versuchsprotokoll

Die nach den Ca²⁺-Ratio Imaging Versuchen in PFA 4% fixierten und in gekühltem PBS – Puffer gelagerten Zellen wurden innerhalb von 14 Tagen nach der Fixation immunzytochemisch untersucht. Alle Schritte fanden unter Zugabe von 0,05% Triton-X-100 statt, welches zu einer erhöhten Permeabilität der Zellmembran führt.

In einem ersten Schritt wurden die Zellen 3 x 5 min in gekühltem PBS – Puffer gewaschen. Danach wurden sie bei Raumtemperatur für 60 min in Block – Lösung inkubiert, was der Sättigung unspezifischer Antigenstrukturen diente. Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte bei 4 °C für 36 – 48 h in Block – Lösung, die des Sekundärantikörpers bei Raumtemperatur für 2 h. Nach jeder Inkubation erfolgte ein Waschschrift (3 x 5 min) mit PBS-T. Zuletzt folgten die Inkubation mit der DAPI – Lösung bei Raumtemperatur für 10 min und ein letzter Waschschrift. Nach diesem konnten die Deckgläschen in Citifluor auf die Objektträger verbracht werden.

3.3.5. Mikroskopie und Auswertung

Die immunzytochemische Auswertung der doppelt bzw. dreifach markierten Primärkulturen erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop mit speziellen Filtern für Alexa Fluor® 488 (ARW 450 – 490 nm), CyTM3 (ARW 510 – 530 nm) und DAPI (ARW 358 nm). Nach Exzitation emittiert Alexa Fluor® 488 grünes Licht, CyTM3 rotes Licht und DAPI blaues Licht. Mit Hilfe einer angeschlossenen digitalen schwarz-weiß Kamera wurden Aufnahmen in allen drei Farbkanälen (grün, rot, blau) und in unterschiedlichen Vergrößerungen angefertigt und mit dem Programm Metamorph zu einem farbigen Bild zusammengefügt. Durch die Trennung der Farbkanäle war es möglich, die einzelnen Antigen-Antikörper-Komplexe isoliert oder in ihrer Gesamtheit zu betrachten.

Mit Hilfe des in die Deckgläschen eingeätzten Rasters konnten die in den vorhergehenden Untersuchungen gemessenen Zellen nun lokalisiert und gemäß ihrer immunzytochemischen Markierung einem Zellphänotypen zugeordnet werden. Durch den Einsatz des primären Antikörpers zur Markierung des Neurotransmitters GABA konnte zusätzlich nachgewiesen werden, ob es sich bei den untersuchten Zellen um GABAerge Neurone handelt.

3.4. Zytokin Bioassays: IL-6 und TNF- α

Das Ziel dieser Versuche war es, einen möglichen Einfluss der Prostaglandine E₂ und D₂ auf die Produktion der bioaktiven Zytokine Interleukin 6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α), induziert durch die Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS), in neuroglialen Primärkulturen des MnPO und des OVLT zu untersuchen.

3.4.1. Grundlage

Mit Hilfe Zellkultur-abhängiger Bioassays lassen sich biologisch aktive Formen spezifischer Zytokine in Flüssigkeiten oder Geweben nachweisen und quantifizieren. Die Methode bietet den Vorteil einer sehr hohen Sensitivität und findet bereits seit vielen

Jahren erfolgreich Anwendung an diesem Institut (Harre et al. 2003; Hatzelmann 2012; Hübschle et al. 2006; Wuchert et al. 2008; Wuchert et al. 2009). Die Grundlage hierfür bilden spezielle Zelllinien, deren Überlebens- und Wachstumsrate in direktem Zusammenhang mit dem Vorhandensein bzw. der Menge des nachzuweisenden Zytokins stehen (Mosmann 1983). Um diese Raten bestimmen zu können, wird die enzymatische (Berridge und Tan 1993) Umwandlung des gelben MTT – Tetrazoliumsalzes in dunkelblaue / violette MTT – Formazan – Kristalle beurteilt, welche nur in vitalen Zellen stattfindet. Die MTT – Formazan – Kristalle, deren Menge direkt proportional zur Anzahl der vitalen Zellen ist (Ibelgauf 1994; Mosmann 1983), können durch ein Isopropanol – HCl – Gemisch gelöst und die Intensität der Farbreaktion photometrisch bestimmt werden.

3.4.2. Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
Actinomycin D	Stocklösung 1 mg / ml
Assay Medium (IL-6)	45 ml RPMI Medium 4 ml FKS 0,5 ml Glutamin (200 nM) 125 µl Mercaptoethanol (200 mM) 65 µl Gentamicin (10 ng/ml)
Assay Medium (TNF- α)	500 ml RPMI Medium 55 ml FKS 5 ml Glutamin (200 nM) 5 ml Penicillin-Streptomycin (5000 I.U./ml)
MTT – Lösung	0,1 g MTT in 20 ml PBS
Neurobasal-A (NBA) Zellkulturmedium	Neurobasal-A Medium B 27 (Endkonzentration 2%) Penicillin/Streptomycin (100 µg/ml) L-Glutamin (2 mM)
Qualitätskontrollen	IL-6 (10 I.U. / ml; 30 I.U. / ml)

Qualitätskontrollen	TNF- α (10 pg / ml; 25 pg / ml)
Standardlösungen	IL-6: 100 I.U./ml TNF- α : 1000 pg/ml
Trypsin	0,25% in PBS, ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺
Wachstumsmedium IL-6	Assay Medium (IL-6) + 500 I.U. IL-6 Standard / ml

3.4.3. Probengewinnung

Zur Gewinnung der zu messenden Proben wurden neurogliale Primärkulturen des MnPO und des OVLT unter sterilen Bedingungen mit LPS, PGE₂, PGD₂ oder einem Gemisch aus LPS und einem der Prostaglandine stimuliert. Nach einem vorab festgelegten Zeitraum wurden die Überstände abgenommen und die Konzentrationen der bioaktiven Zytokine IL-6 und TNF- α mit Hilfe der Assays ermittelt.

Die Stimulantien wurden vor Beginn der Stimulation in erwärmtem (37 °C) NBA – Medium auf Ihre Endkonzentration verdünnt. Anschließend wurden die Zellkulturen mit dem erwärmten NBA – Medium gewaschen, um bereits während der Wachstumsphase akkumulierte Zytokine aus dem Überstand zu entfernen und somit eine Verfälschung der Messergebnisse zu vermeiden. Das frische Medium wurde wieder entfernt und 350 μ l einer der folgenden Stimulationslösung auf die Zellkultur gegeben.

- Kontrolle (PBS in NBA – Medium 1:50)
- LPS (10 μ g / ml)
- PGE₂ (10⁻⁵ M)
- PGD₂ (10⁻⁵ M)
- LPS (10 μ g / ml) + PGE₂ (10⁻⁵ M)
- LPS (10 μ g / ml) + PGD₂ (10⁻⁵ M)

Für die Kontrolle wurde PBS gewählt, da sowohl das LPS, als auch die Prostaglandine in PBS gelöst wurden. Die Zellkulturen wurden je nach Versuchsreihe für 120 oder 360 min stimuliert. Anschließend wurden die Überstände abgenommen und bis zur endgültigen Analyse der Zytokine bei -20 °C gelagert.

3.4.4. IL-6 Assay

Für diesen Assay wurde die 1986 entwickelte B9-Hybridoma-Zelllinie genutzt (Aarden et al. 1987; Lansdorp et al. 1986; Van Oers et al. 1988). Diese Zelllinie zeigt eine sehr sensitive, dosisabhängige Proliferation unter Einfluss von bioaktivem IL-6, d.h. es kann ein direkter Rückschluss aus der Anzahl der proliferierenden Zellen auf die in der Probe enthaltene Menge von bioaktivem IL-6 gezogen werden. Die minimal zu detektierende Konzentration an IL-6 liegt bei diesem Assay bei 3 I.U. / ml (Ross et al. 2003).

Zur Kultivierung der B9-Zellen wurden diese in einem Brutschrank bei 37 °C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit in einem Wachstumsmedium aufbewahrt und alle 3 Tage passagiert. Die Zellsuspension für 10 min bei 2300 U/min abzentrifugiert und in Assay Medium resuspendiert. Nach zweimaliger Wiederholung dieser Prozedur wurde die Suspension auf eine Zellzahl von 5.000 / 100 µl verdünnt und in sterile 96-Well-Mikrotiterplatten ausplattiert. In diese wurden anschließend Verdünnungsreihen des IL-6 Standards, der Qualitätskontrollen und der zu untersuchenden Proben eingebracht. Die Platten wurden für 72 h im Brutschrank inkubiert und anschließend 25 µl MTT in jedes Well hinzugegeben, gefolgt von einer weiteren, 4 stündigen Inkubation. Daraufhin wurden 125 µl Überstand abgenommen, 100 µl des Isopropanol – HCl – Gemischs in jedes Well gegeben und die Platten erneut für mindestens 12 h bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Im Anschluss wurde die optische Dichte der Suspension bei 550 nm photometrisch bestimmt.

3.4.5. TNF- α Assay

Die Grundlage dieses Assays bildet die zytotoxische Wirkung von TNF- α auf die murine Fibrosarkomzelllinie WEHI 164 subclone 13 (Espevik und Nissen-Meyer 1986), d.h. TNF- α führt zu einem dosisabhängigen Absterben der Zellen und lässt somit Rückschlüsse auf die Menge des in der Probe enthaltenen TNF- α zu (Ross et al. 2003). Die minimal zu detektierende Konzentration an TNF- α liegt bei diesem Assay bei 6 pg / ml (Mullis und Faloona 1987).

Da diese Zelllinie, im Gegensatz zur B9-Hybridoma-Zelllinie, ein adhärentes Wachstum aufweist, wurde zur Subkultivierung das proteolytische Enzym Trypsin zum Ablösen der Zellen eingesetzt. Der Assay selbst erfolgte analog zum IL-6 Assay, jedoch wurde die Zellsuspension auf 50.000 / 100 µl verdünnt und anschließend 4 µg des Zytostatikums Actinomycin D hinzugegeben, um eine weitere Proliferation der Zellen zu unterdrücken und eine Sensibilisierung der Zellen gegenüber TNF- α zu erreichen. Die erste Inkubation der Zellen mit den Proben fand über 24 h statt, alle weiteren Schritte wurden analog zum IL-6 Assay ausgeführt.

3.4.6. Auswertung und Statistik

Mit Hilfe der Standardlösungen wurden zunächst Eichkurven für IL-6 und TNF- α erstellt, wobei die ermittelten OD-Werte gegen die logarithmierten Zytokinkonzentrationen aufgetragen wurden. Diese Eichkurven zeigen einen charakteristischen linearen Bereich, in welchem eine direkte Proportionalität zwischen der OD und der Konzentration besteht, und nur Messergebnisse aus diesem Bereich wurden zur Auswertung der Zytokinkonzentrationen genutzt. Mit Hilfe der Gleichung der Regressionsgeraden und des Verdünnungsfaktors der gemessenen Probe wurde letztendlich die Konzentration von IL-6 bzw. TNF- α in der Probe ermittelt. Die so ermittelten Werte wurden nach Stimulanz und Stimulationsdauer gruppiert und die arithmetischen Mittelwerte (MW) \pm Standardfehler der Mittelwerte (SEM) errechnet. Für die weitere Auswertung wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit dem Newman-Keuls Post-hoc Test zur Analyse der statistischen Signifikanz durchgeführt. Unterschiede zwischen den Mittelwerten mit einem $p \leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant erachtet.

E. ERWEITERTE DISKUSSION

Die wichtigsten Befunde, die im Rahmen der vorgelegten Dissertationsschrift erhoben wurden, können wie folgt zusammengefasst werden.

1. Es gibt eine Population mittelgroßer Neurone der Spinalganglien, die als Kältesensoren einzuordnen sind und direkt durch PGE_2 aktiviert werden können.
2. Die Stärke der durch PGE_2 hervorgerufenen zellulären Reaktionen wird in einem Teil dieser Neurone durch das anti-inflammatorisch wirksame Eicosanoid PGD_2 moduliert.
3. Im OVLT, einer Hirnstruktur mit unvollständiger Blut-Hirn-Schranke, werden Populationen von Neuronen, Astrozyten und Mikroglia direkt durch PGE_2 aktiviert; dies ist im MnPO, einer Struktur mit vollständiger Blut-Hirn-Schranke, nicht der Fall.
4. Im MnPO verstärkt PGE_2 die durch Glutamat induzierten zellulären Antworten in etwa einem Drittel der Neurone; von diesen wiederum verwenden ca. 30% den Neurotransmitter GABA.
5. Die LPS-induzierte Bildung pro-inflammatorischer Zytokine durch Primärkulturen des OVLT und MnPO wird durch Inkubation mit PGE_2 und PGD_2 signifikant abgeschwächt. Dies zeigt, dass der in der Körperperipherie beschriebene negative Feedback, den PGE_2 auf die stimulierte Bildung von $\text{TNF-}\alpha$ ausübt, auch im Gehirn existiert.

1. Die Beeinflussung peripherer Kältesensoren durch PGE_2

Bei Betrachtung der Funktionsweise des Thermoregulationssystems der Säuger ist eine zentrale Bedeutung von PGE_2 innerhalb der präoptischen Region bzw. der rostralen Region des Hypothalamus etabliert und generell anerkannt (Ivanov und Romanovsky 2004; Milton 1998; Pecchi et al. 2009; Roth und Blatteis 2014). In einem kürzlich publizierten Artikel wurde die Frage aufgeworfen und diskutiert, ob PGE_2 nicht nur bei Fieber, sondern auch bei den thermoregulatorischen Reaktionen eine Rolle spielen könnte, die man bei Einwirkung einer kalten Umgebungstemperatur beobachtet (Foster

et al. 2015). Der Hintergrund dieser Hypothese ist darin zu sehen, dass man bei äußerer Abkühlung dieselben Reaktionen (Zittern / Schüttelfrost, Stoffwechselsteigerung, periphere Vasokonstriktion) beobachtet wie in der Phase des Fieberanstiegs, für dessen Entstehung die Beteiligung von PGE₂ als essentiell angesehen wird (Roth und Blatteis 2014). Zur Unterstützung ihrer Hypothese wurden von Foster et al. (2015) tierexperimentelle Arbeiten zitiert, in denen die Gabe von COX-Inhibitoren zur Reduktion der Körpertemperatur unter nicht-fieberhaften Bedingungen führte (Ayoub et al. 2004; Ayoub et al. 2011; Satinoff 1972). So wurde gezeigt, dass Ratten, die mit dem COX-Inhibitor Acetylsalicylsäure behandelt wurden, bei anschließender Kälteexposition ihre Körpertemperatur im Vergleich zu der mit 0,9% NaCl-Lösung behandelten Kontrollgruppe deutlich schlechter verteidigen konnten, sie entwickelten eine stärkere Hypothermie (Bizzi et al. 1965; Satinoff 1972). Eine Gabe von Acetaminophen (Paracetamol) in relativ hoher Dosierung (150-300 mg/kg) führte bei Mäusen sogar ohne Einfluss einer Kälteexposition zur Entwicklung einer deutlichen Hypothermie (Ayoub et al. 2004; Ayoub et al. 2011; Li et al. 2008). Jedoch wurden auch Befunde publiziert, die gegen eine solche Hypothese sprechen: bei Katzen scheint PGE₂ keine signifikante Rolle für Kälteabwehrreaktionen zu spielen (Cranston et al. 1975). Beim Menschen jedoch scheint ähnlich wie bei den klassischen Labornagern PGE₂ zur Thermoregulation unter nicht-fieberhaften Bedingungen beizutragen. So führte bei fieberfreien Patienten mit Schlaganfall eine Behandlung mit Acetaminophen zu einem Absinken der Körpertemperatur um 0,4°C (Dippel et al. 2001; Dippel et al. 2003). Auch eine durch starke körperliche Belastung induzierte Hyperthermie konnte bei Probanden durch Paracetamol abgeschwächt werden, wodurch sich der Zeitpunkt des Belastungsabbruchs verzögerte (Mauger et al. 2014). Eine Überdosierung mit Acetaminophen (50 g, oral) kann sogar zu einer lebensbedrohlichen Hypothermie führen (Rollstin und Seifert 2013).

Bei der Diskussion dieser und anderer Befunde aus experimentellen und klinischen Studien wurde als Wirkungsort von PGE₂ auf die Thermoregulation unter nicht fieberhaften Bedingungen das Augenmerk ausschließlich auf die präoptische Region / den vorderen Hypothalamus gerichtet. In den hier vorgestellten Experimenten ergaben sich jedoch klare Hinweise dafür, dass eine Stimulation thermoregulatorischer Wärmebildung durch PGE₂ durch direkten Einfluss auf periphere Kältesensoren erfolgen könnte (Abbildung 15).

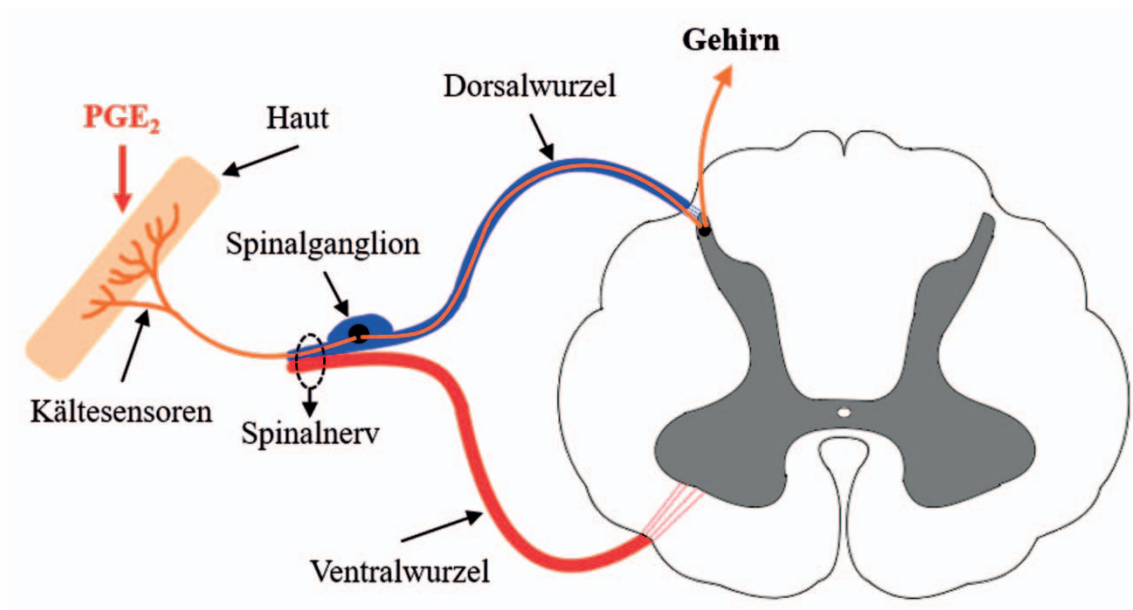


Abbildung 15: Schematische Darstellung des Ausgangspunkts des thermafferenten Systems beginnend mit Kältesensoren der Haut, deren Axone in die Dorsalhörner des Rückenmarks ziehen und dort auf ein zweites Neuron verschaltet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Population von Kältesensoren identifiziert, die durch Kälte / Menthol und durch PGE_2 aktiviert wird. Die Aktivierung dieser Fasern durch PGE_2 könnte in gewissem Umfang zur Fieberentstehung und generell zur thermoregulatorischen Wärmebildung beitragen.

Eine Aktivierung peripherer Kältesensoren durch absinkende Temperaturen oder durch Menthol löst über die Aktivierung von TRPM8 vergleichbare Reaktionen aus, wie sie in der Phase des Fieberanstiegs beobachtet werden (Almeida et al. 2012; Roth und Blatteis 2014). Die Identifizierung einer Population an Neuronen der Spinalganglien, die sowohl durch Menthol als auch durch PGE_2 stimuliert werden, liefert somit eine alternative Erklärungsmöglichkeit für die Einflüsse von PGE_2 auf die „normale“ Temperaturregulation und die beschriebenen Effekte von COX-Inhibitoren auf die Körpertemperatur. Auch einige frühere Studien unserer Arbeitsgruppe (Ross et al. 2000; Ross et al. 2003; Rummel et al. 2004; Rummel et al. 2005) lassen sich durch die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Befunde besser erklären. So führt die subkutane Injektion von LPS in eine künstliche Kammer mit Hautkontakt oder eine subkutan angelegte Lufttasche bei Meerschweinchen und Ratten zu einer reproduzierbaren Fieberreaktion (Knorr et al. 2008; Knorr et al. 2010; Ross et al. 2000). Die zirkulierenden Spiegel der wichtigsten pyrogenen Zytokine bleiben in diesem Modell unter der Nachweisgrenze ($\text{TNF-}\alpha$; $\text{IL-1}\beta$) oder sind vergleichsweise niedrig (IL-6). Auf der anderen Seite lässt sich das beobachtete Fieber durch Injektionen eines Lokalanästhetikums (Ross et al. 2000) oder eines COX-Inhibitors in sehr niedriger

Dosierung, die systemische Effekte ausschließt (Rummel et al. 2005), direkt in das subkutane Kompartiment signifikant abschwächen. In diesen älteren Studien war postuliert worden, dass lokal (subkutan) gebildetes PGE₂ über eine Aktivierung von Hautafferenzen in moderatem Umfang zur Ausbildung einer Fieberreaktion in diesem Modell beiträgt. Im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit wurde nun erstmals der mögliche Mechanismus beschrieben, dem diese Effekte zugrunde liegen. Diese Studie leistet somit einen signifikanten Beitrag zu der kontrovers diskutierten Frage ob inflammatorische Signale über afferente Nervenverbindungen zur Ausbildung von Fieber und *sickness behavior* beitragen können (Blatteis und Sehic 1997; Dantzer et al. 2000; Goldbach et al. 1997; Konsman et al. 2000; Konsman et al. 2002; Luheshi et al. 2000).

2. Die Modulation der PGE₂-vermittelten Beeinflussung peripherer Kältesensoren durch PGD₂

Eine weitere im Rahmen dieser Arbeit erstmals beschriebene Beobachtung war die Modulation der Stärke der PGE₂-induzierten Ca²⁺-Signale in Neuronen der Spinalganglien durch PGD₂. Die in der Literatur beschriebenen Eigenschaften von PGD₂ wurden bislang ausschließlich genomischen Effekten über seinen Metaboliten 15-d-PGJ₂ zugeschrieben. Wie bereits in der Literaturübersicht beschrieben führt 15-d-PGJ₂ zur Aktivierung von PPARs. Dies wiederum verursacht über eine Hemmung des pro-inflammatorischen Transkriptionsfaktors NF-κB eine reduzierte Expression von Zytokinen und COX-2 / mPGES-1 nach entsprechender Stimulation (Harris und Phipps 2002; Joo und Sadikot 2012; Sandig et al. 2007; Straus et al. 2000). Ein derartiger Mechanismus kann nicht für die in unseren Experimenten beobachtete Modulation der PGE₂-induzierten Ca²⁺-Signale verantwortlich sein, da dieser Effekt eine direkte zelluläre Reaktion ist, die sich unmittelbar nach Gabe von PGD₂ im Zeitraum von wenigen Minuten manifestiert. Jedoch kann auch diese Eigenschaft von PGD₂ zu dem ihm zugeschriebenen anti-inflammatorischen Potenzial beitragen, speziell was die signifikante Reduktion der PGE₂-induzierten Ca²⁺-Signale in einer Population mittelgroßer Neurone der Spinalganglien betrifft. Derartige modulatorische Wirkungen, verstärkende wie abschwächende, auf spinale Neurone wurden auch bereits für andere inflammatorische oder dem afferenten Schmerzsystem zuzuordnende Mediatoren

beschrieben (Castillo et al. 2011; Linte et al. 2007; Smith et al. 2000a; Zhang et al. 2012). Selbst für einen direkten Antagonismus zwischen PGE_2 und PGD_2 gibt es Hinweise in der Literatur (Kunikata et al. 2005). Neben der Abschwächung PGE_2 -induzierter Ca^{2+} -Signale konnten wir in einem Teil der untersuchten Neurone der Spinalganglien auch durch PGD_2 verursachte kleine Anstiege der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration beobachten. Diese beiden unterschiedlichen Effekte könnten durch Aktivierung der beiden unterschiedlichen Rezeptoren für PGD_2 erklärbar sein. Aktivierung des PGD_2 -Rezeptor Subtyps DP2 führt bekanntermaßen zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, während Aktivierung von DP1 mit einem Absinken des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels assoziiert ist (Liu et al. 2013). Somit könnten die in einigen Zellen beobachteten moderaten PGD_2 -induzierten Ca^{2+} -Signale durch eine Aktivierung des DP2-Rezeptors verursacht worden sein. Die Abschwächung der vergleichsweise starken PGE_2 -induzierten Ca^{2+} -Signale durch PGD_2 wären demzufolge durch Aktivierung des DP1-Rezeptors verursacht worden. Zur endgültigen Abklärung dieser Hypothese wären jedoch weiterführende Untersuchungen auf zellulärer Ebene erforderlich. Es bleibt festzuhalten, dass mögliche anti-inflammatorische Effekte von PGD_2 nach unseren Befunden nicht ausschließlich über eine genomische Beeinflussung der spinalen Neurone mittels PPARs verursacht sein können.

3. Direkte Reaktivität des OVLT gegenüber PGE_2

Das OVLT gehört zusammen mit dem *Organum subfornicale* (SFO) und der *Area postrema* zu den sensorischen CVOs. Diese Untergruppe der CVOs verfügt über Blutkapillaren mit fenestriertem Endothel, das von perivaskulären Räumen umgeben wird. Von den Ventrikeln werden diese Strukturen durch Ependymzellen abgegrenzt. Zusammen mit dem SFO liegt das OVLT in der Wand des 3. Hirnventrikels, der so bezeichneten *Lamina terminalis* (siehe Abbildung 16). Das Parenchym der sensorischen CVOs besteht wie andere Hirnregionen aus glialen und neuronalen Elementen. Durch das Fehlen einer vollständigen Blut-Hirn-Schranke sind die sensorischen CVOs einer ganzen Reihe an zirkulierenden Botenstoffen ausgesetzt, für die sie über entsprechende Rezeptoren verfügen. Hierzu gehören Substanzen / Rezeptoren, die im Dienste der Regulation des Salz- und Wasserhaushalts und des kardiovaskulären Systems stehen wie

z.B. Angiotensin II, Atriales natriuretisches Peptid, Noradrenalin oder Endothelin (Gebke et al. 2000; Gerstberger et al. 1992; McKinley et al. 1999; Quirion et al. 1986; Roth et al. 2004). Wie bereits in der Literaturübersicht beschrieben, wurde speziell dem OVLT bereits seit langem eine wichtige Rolle als Eintrittspforte für inflammatorische Signalmoleküle in das ZNS zugeschrieben. So konnten beispielsweise Meerschweinchen und Schafe, bei denen das OVLT elektrolytisch zerstört wurde, nach peripherer Injektion von LPS kein Fieber mehr entwickeln (Blatteis et al. 1983; Blatteis et al. 1987). Obwohl derartige Läsionsstudien nicht unumstritten sind (Romanovsky et al. 2003), gibt es weitere Argumente, die für eine Beteiligung des OVLT beim Transfer inflammatorischer Signale vom Blut in das ZNS sprechen. Diese Argumente beziehen sich auf die massive Expression von Rezeptoren für diverse PAMPs und Zytokine im Bereich des OVLT und die Nachweise starker Aktivierung dieser Hirnstruktur auf zellulärer Ebene unter Bedingungen einer systemischen Inflammation (Roth et al. 2004, zur Übersicht). Dies gilt auch für das pro-inflammatorische Signalmolekül PGE_2 , das im Fokus der hier durchgeführten Untersuchungen stand. Zwar ist die Dichte der im Bereich des OVLT nachweisbaren Bindungsstellen für PGE_2 nicht so hoch wie im benachbarten MnPO (Matsumura et al. 1990), jedoch konnten speziell die Rezeptoren vom Subtyp EP1 und EP4 im OVLT nachgewiesen werden (Oka et al. 2000). Für einzelne im Bereich des OVLT lokalisierte Neurone konnte auch die Existenz des für die Ausbildung von Fieber besonders wichtigen EP3-Rezeptors direkt bewiesen werden (Yoshida et al. 2003).

Für die Ausbildung der frühen Phase des LPS-induzierten Fiebers wird peripher gebildetes PGE_2 verantwortlich gemacht, während die längeren späten Fieberphasen durch PGE_2 vermittelt werden, das vornehmlich vom Hirnendothel und anderen Zellen des ZNS gebildet wird (Roth und Blatteis 2014; Steiner et al. 2006). Neben der im vorherigen Abschnitt diskutierten Möglichkeit, dass peripher gebildetes PGE_2 periphere Kältesensoren oder andere nervale Afferenzen aktiviert, muss somit auch die Möglichkeit der Beeinflussung des OVLT durch zirkulierendes PGE_2 in Betracht gezogen werden. In diesem Zusammenhang schien es so zu sein, dass PGE_2 im Blut zunächst an Albumin als Trägersubstanz gebunden werden muss, um im Gehirn als pyrogener Mediator seine Wirksamkeit zu entfalten (Ootsuka et al. 2008; Romanovsky et al. 1999; Steiner et al. 2006). Wenn dies zutreffen sollte, wäre eine Beeinflussung des Gehirns zur Initiierung einer Fieberreaktion in der Tat nur im Bereich der CVOs, speziell im OVLT möglich, da nur hier das Trägerprotein mit dem zu transportierenden PGE_2 in das Gehirn eintreten kann.

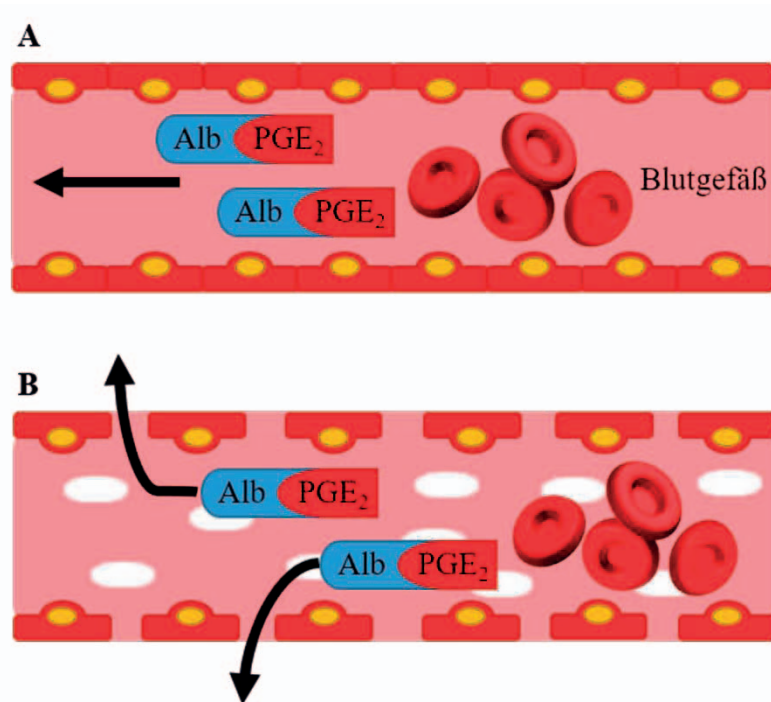


Abbildung 16: Schematische Darstellung der Möglichkeit des Eintritts von Albumin-gebundenem PGE₂ in das Gehirn

Während in den meisten Gehirnstrukturen der Übertritt von Albumin-gebundenem PGE₂ durch die Blut-Hirn-Schranke verhindert wird (A), wäre dies im Bereich des OVLT aufgrund der dort vorliegenden strukturellen Besonderheiten durchaus möglich (B).

Abkürzungen: Alb = Albumin; PGE₂ = Prostaglandin E₂

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigen in der Tat, dass es im OVLT beträchtliche Populationen besonders an Astrozyten und Mikrogliazellen, aber auch an Neuronen gibt, die direkt durch PGE₂ aktiviert werden, was sich in den Versuchen als deutlicher, transientser Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration manifestierte. Da sich derartige Reaktionen im MnPO, einer innerhalb der Blut-Hirn-Schranke gelegenen Struktur, fast gar nicht manifestierten, stellt sich die Frage, ob dies mit einer unterschiedlichen Verteilung der EP1-4-Rezeptoren in OVLT und MnPO zusammenhängen könnte. Der im OVLT maßgeblich exprimierte Rezeptor-Subtyp EP1 (Oka et al. 2000; Oka 2004) setzt Anstiege der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration als *second messenger* System ein. Die beobachteten PGE₂-induzierten Ca²⁺-Signale in Zellen des OVLT könnten somit durchaus mit einer direkten Aktivierung von EP1-Rezeptoren in Zusammenhang stehen. In der Tat zeigte eine Studie an EP1-Rezeptor-defizienten Mäusen, dass dieser Rezeptor nur für die frühe Fieberphase eine gewisse Bedeutung zu haben scheint (Oka et al. 2003a). Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Befunde würden diese Hypothese somit unterstützen.

Es bleibt jedoch festzuhalten, dass die Mehrzahl der in diesen Untersuchungen direkt durch PGE₂ aktivierbaren Zellen in Primärkulturen des OVLT nicht-neuronalen Ursprungs war. So waren PGE₂-vermittelte Ca²⁺-Signale in einer beträchtlichen Zahl an Astrozyten (120 von 645 untersuchten Einzelzellen) zu beobachten. Von Astrozyten weiß man, dass sie sich an der schnellen interzellulären Kommunikation im ZNS direkt durch Freisetzung von Glutamat beteiligen (Cali et al. 2014). In dieser Studie konnte auch gezeigt werden, dass Astrozyten auf Stimulation mit PGE₂ mit einer Ca²⁺-abhängigen Freisetzung von Glutamat reagieren. Unter der Voraussetzung, dass ein derartiger Mechanismus auch im OVLT wirksam wäre, könnte lokal im Bereich des OVLT durch PGE₂ freigesetztes Glutamat direkt die vorhanden neuronalen Verbindungen zum MnPO aktivieren. Ob ein solcher Mechanismus tatsächlich zu den bekannten Veränderungen des Funktionszustands des MnPO unter Bedingungen einer systemischen Inflammation beiträgt, bleibt jedoch zunächst spekulativ.

4. Modulation der Stärke Glutamat-induzierter Ca²⁺-Signale in Neuronen des MnPO durch PGE₂

Im Gegensatz zum OVLT war eine direkte Responsivität von Zellen aus Primärkulturen des MnPO gegenüber PGE₂, die sich in markanten Ca²⁺-Signalen äußerte, kaum nachweisbar. Dieses so unterschiedliche Verhalten zweier direkt benachbarter Gehirnstrukturen lässt sich zunächst mit der sehr verschiedenen Ausstattung an Rezeptoren erklären. Der bevorzugten Expression von EP1 im OVLT steht die dominierende Expression von EP3 im MnPO gegenüber. Wie bereits in der Literaturübersicht angesprochen wird dem Rezeptor EP3 im Bereich des MnPO eine kritische Rolle bei der Manifestierung der Fieberreaktion zugesprochen (Oka et al. 2003b; Ushikubi et al. 1998). Traditionell wird der Mechanismus, über den PGE₂ im MnPO seine pyrogene Wirkung entfaltet wie folgt beschrieben: Der MnPO und die benachbarten Strukturen der POA sind durch eine hohe Anzahl an warmsensitiven Neuronen charakterisiert (Boulant und Dean 1986; Wechselberger et al. 2006). Diese Neurone erhöhen ihre Entladungsrate mit steigender Temperatur. Mehrere ältere Studien konnten zeigen, dass PGE₂ die Aktivität (Entladungsrate) dieser Wärme-sensitiven Neurone hemmt (Hori et al. 1988; Matsuda et al. 1992; Rannels und Griffin 2003). Dies würde zu

einer stärkeren Gewichtung des Inputs peripherer Kältesensoren in das Thermoregulationssystem und dadurch zu Reaktionen führen, wie sie in der Phase des Fieberanstiegs beobachtet werden. Da der für die Fieberreaktion so wichtige EP3 Rezeptor über ein G-Protein zur Verminderung der intrazellulären Konzentration des *second messengers* cAMP führt, wurde postuliert, dass die Bindung von PGE₂ an den EP3-Rezeptor die Warmsensitivität der MnPO-Neurone über einen Abfall des cAMP-Spiegels reduziert (Nakamura 2011; Steiner et al. 2002). Es wurde jedoch bislang noch nicht nachgewiesen, dass es sich bei den EP3-Rezeptor exprimierenden Neuronen tatsächlich um Wärme-sensitive Neurone handelt.

Die neueren Modelle zur Organisation des zentralen Anteils des Thermoregulationssystems gehen davon aus, dass GABAerge Neurone im MnPO, die über den Neurotransmitter Glutamat stimuliert werden, zu einer Enthemmung von Wärmebildungsmechanismen führen (Morrison und Nakamura 2011; Nakamura 2011). Würde PGE₂ bei diesem Mechanismus interferieren, müsste es die Glutamat-induzierte Aktivierung GABAerger Neurone verstärken. Genau dieser Effekt von PGE₂ konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit an Primärkulturen des MnPO dokumentiert werden. Bei einer markanten Zahl an MnPO-Neuronen (und Astrozyten) wurden Glutamat-induzierte Ca²⁺-Signale signifikant verstärkt. Bei den durch PGE₂ derart in ihrer Aktivität modulierten (verstärkten) Neuronen wiederum handelte es sich zu knapp 30% um GABAerge Neurone. Wie nun lässt sich dieser Befund mit der Signaltransduktion am EP3-Rezeptor in Einklang bringen? Prinzipiell kann ein Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration nach Aktivierung aller PGE₂-Rezeptorsubtypen EP1-EP4 erfolgen. Für den im MnPO so wichtigen EP3-Rezeptor, der an ein inhibitorisches G-Protein gekoppelt ist, wurde gezeigt, dass die Untereinheit G_{γβ} eben dieses inhibitorischen G-Proteins zu einer Ca²⁺-Mobilisierung führt (Hatae et al. 2002). Dies könnte zu der von uns beobachteten Verstärkung der Glutamat-induzierten Ca²⁺-Signale in MnPO-Neuronen bzw. Astrozyten geführt haben. Andererseits wurde in der präoptischen Region die Existenz verschiedener Spleißvarianten des EP3 Rezeptors beschrieben (Vasilache et al. 2007), von denen zumindest zwei nach Stimulation mit PGE₂ den IP3 / Ca²⁺-Signalweg aktivieren (Schmid et al. 1995). Die Beobachtung einer Verstärkung Glutamat-induzierter Ca²⁺-Signale durch PGE₂ steht jedenfalls im Einklang mit einer elektrophysiologischen Studie an dissoziierten Neuronen der präoptischen Region (Katafuchi et al. 2005). Eine Perfusion dieser dissoziierten Neurone mit PGE₂ verursachte *per se* keine messbaren Ionenströme an der Zellmembran. Jedoch wurden Glutamat-induzierte Ca²⁺-Ströme in

diesen Zellen durch PGE₂ verstärkt (Katafuchi et al. 2005). Ähnliche modulatorische Effekte anderer neuroaktiver Moleküle auf Glutamat-induzierte Ca²⁺-Signale wurden auch für Primärkulturen hypothalamischer Neurone der Ratte beschrieben (Kopp et al. 2001; Obrietan et al. 1995). Das Peptid PACAP (Hypophysen-Adenylatzyklase-aktivierendes Polypeptid) verstärkte Glutamat-induzierte Ca²⁺-Signale über eine Interaktion mit ionotropen Glutamat-Rezeptoren, während eine Abschwächung derartiger Signale durch Interaktion von PACAP mit metabotropen Glutamat-Rezeptoren verursacht wurde. Auch in den hier durchgeführten Versuchen wurden zwei Populationen an PGE₂-modulierten präoptischen Neuronen identifiziert, wobei PGE₂ die Glutamatantwort bei einer Gruppe verstärkte, bei der anderen Gruppe jedoch abschwächte. Ob es sich auch hier um den Effekt einer Beeinflussung unterschiedlicher Glutamat-Rezeptoren gehandelt hat, bleibt zunächst offen.

In Übereinstimmung mit *in vivo*-Untersuchungen (Nakamura et al. 2002) wurde in der vorliegenden Studie an Primärkulturen des MnPO gefunden, dass etwa 30% der durch PGE₂ modulierten Glutamatantworten in GABAergen Neuronen erfolgten. Diese hier beschriebenen Neurone könnten unter *in vivo*-Bedingungen also tatsächlich dafür verantwortlich sein, dass ihre Aktivierung durch Glutamat und die Verstärkung dieser Aktivierung durch PGE₂ zur stärkeren Enthemmung von Wärmebildungsmechanismen und damit zu den in der Phase eines Fieberanstiegs beobachteten Reaktionen führt. Man kann mit Untersuchungen nach dem hier vorgestellten Ablauf somit tatsächlich in Bezug auf ganz bestimmte Fragestellungen zur Reduktion von Ganztierversuchen beitragen, wobei diese jedoch nicht vollständig ersetzt werden können.

5. Modulation der LPS-induzierten Produktion von Zytokinen durch PGE₂ in Kulturen des OVLT und des MnPO

Endothelzellen der Hirngefäße werden unter den Bedingungen einer systemischen Inflammation als die wichtigsten Produzenten von PGE₂ im Gehirn angesehen. Hierbei werden die Endothelzellen von der Blutseite aus über die dort existierenden Rezeptoren für Zytokine oder LPS und andere PAMPs aktiviert, was unter anderem zu einer gekoppelten Induktion von COX-2 / mPGES1 führt (Chakravarty und Herkenham 2005; Eskilsson et al. 2014; Laflamme und Rivest 2001). Das von diesen induzierbaren

Enzymen gebildete PGE₂ wird dann auf der abluminalen Seite in das Gehirnparenchym abgegeben (Engström et al. 2012; Inoue et al. 2002; Konsman et al. 2004; Yamagata et al. 2001). Als Folge einer derartigen inflammatorischen Aktivierung von Zellen, welche an der Ausbildung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt sind, propagiert der inflammatorische Prozess in das Gehirnparenchym, sodass nun hier eine „zweite Welle“ an Zytokinen und anderen Mediatoren gebildet wird. Diese sind an der Entstehung späterer Phasen der zentralnervös kontrollierten Krankheitssymptome beteiligt, eine Bildung der Zytokine im ZNS wird hauptsächlich Mikrogliazellen zugeschrieben (Ott et al. 2010; Roth und Blatteis 2014; Wuchert et al. 2008; Wuchert et al. 2009). Ein wesentlicher Punkt, in dem sich die im Rahmen dieser Studie eingesetzten Primärkulturen von der *in vivo* Situation unterscheiden ist das Fehlen von Endothelzellen in diesen Kulturen. Endothelzellen würden in Co-Kultur die Kultivierung neuro-glialer Elemente überlagern und unterdrücken. Es war für die hier vorgestellten Untersuchungen jedoch wichtig zu wissen, wie sich das von Endothelzellen in hohem Umfang gebildete PGE₂ auf die Kapazität der betreffenden Hirnstrukturen zur Bildung pro-inflammatorischer Mediatoren auswirkt (hier: TNF- α und IL-6). Die Exposition der neuro-glialen Elemente des OVLT und des MnPO mit PGE₂ wurde daher experimentell simuliert und die Auswirkung einer Inkubation mit PGE₂ auf die LPS-induzierte Bildung von TNF- α und IL-6 analysiert. Vergleichend wurden auch Kulturen mit PGD₂ inkubiert, einem Prostanoid mit allgemein anerkannten anti-inflammatorischen Eigenschaften. Der Kernbefund dieses Experiments, dass Inkubation der Kulturen beider Hirnstrukturen mit PGE₂ die LPS-induzierte Freisetzung von IL-6, besonders aber von TNF- α , stärker hemmte als eine Inkubation mit PGD₂, war zunächst überraschend. Einige ältere Studien an intakten Versuchstieren oder an isolierten Makrophagen hatten jedoch zumindest für die Körperperipherie angedeutet, dass es eine reziproke Beeinflussung zwischen PGE₂ und TNF- α bezüglich ihrer jeweiligen Stimulus-induzierten Bildung gibt. So wurde bei Mäusen (Kozak et al. 1997), Meerschweinchen (Roth et al. 2002) und Menschen (Martich et al. 1991) beobachtet, dass die nach LPS-Injektion verzeichneten Anstiege an TNF- α im Blut durch eine Behandlung mit COX-Inhibitoren massiv verstärkt wurden. In einer weiteren Studie wurden Mäuse einer mit Fischöl-angereicherten Diät unterzogen. Diese Mäuse zeigten nach Injektion von LPS nicht den im Normalfall auftretenden Anstieg an PGE₂ in Plasma, jedoch eine massiv verstärkte Freisetzung von TNF- α (Kozak et al. 1997). Auch für isolierte Makrophagen wurden hemmende Einflüsse von PGE₂ auf eine induzierte Freisetzung von

TNF- α beschrieben (Fieren et al. 1991; Kunkel et al. 1986). All diese Befunde wurden kürzlich in Zusammenhang mit klinischen Beobachtungen assoziiert, in denen eine Behandlung von septischen Patienten mit COX-Inhibitoren sich eher als nachteilig für die Genesung oder sogar das Überleben der Patienten darstellte (Harden et al. 2015).

Die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Befunde zeigten zum ersten Mal, dass ein derartiger Mechanismus auch im Gehirn existiert. Die Vorstellung dass PGE₂ im ZNS ein negatives Feedback Signal zur Limitierung neuroinflammatorischer Prozesse repräsentiert, war bereits vorgeschlagen worden (Brenneis et al. 2011; Zhang und Rivest 2001). Die hier verwendeten OVLT und MnPO Kulturen zeigten jedenfalls eine deutlich abgeschwächte Bildung von TNF- α durch die Inkubation mit exogen zugefügtem PGE₂. Ob TNF- α im ZNS jedoch pro- oder anti-inflammatorische Effekte ausübt, hängt von dem in der untersuchten Struktur exprimierten TNF-Rezeptor ab. Pro-inflammatorische Effekte werden über den Typ-I (p55) TNF-Rezeptor vermittelt, während die TNF-induzierte Signaltransduktion am Typ-II (p75)-Rezeptor eher anti-inflammatorisch wirkt (Kassiotis und Kollias 2001; Masli und Turpie 2009).

Schlussfolgerungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden experimentelle Befunde vorgestellt, die zeigen, dass PGE₂ nicht nur im ZNS, sondern auch in peripheren Strukturen (Kältesensoren) des Thermoregulationssystems zelluläre Reaktionen hervorruft, die zum Teil ein neues Licht auf die Rolle dieser Substanz bei der Fieberentstehung und der Entstehung von Neuroinflammation werfen. Diese Befunde begründen auch erneut die Frage nach möglichen Konsequenzen des weit verbreiteten Einsatzes PGE₂-hemmender Medikamente. Da es an verschiedensten Stellen des Thermoregulationssystems der Säuger Rezeptoren für PGE₂ gibt, wurde kürzlich die provokative Hypothese aufgestellt, ob die Einnahme nicht-steroidaler-anti-inflammatorischer Medikamente (NSAIDs) die natürlichen Fähigkeiten zur Thermoregulation (z.B. bei starker Kälteexposition) beeinträchtigen könnte (Foster et al. 2015). Ob und in welchem Umfang PGE₂ tatsächlich die „normale“ Thermoregulation in Abwesenheit von Fieber signifikant beeinflusst, erfordert weiterführende experimentelle Untersuchungen.

F. ZUSAMMENFASSUNG

Obwohl eine wichtige Rolle für PGE₂ bei der Entstehung von Fieber und einigen anderen Krankheitssymptomen allgemein anerkannt wird, ist das Wissen über die exakten Wirkorte und die durch PGE₂ hervorgerufenen zellulären Reaktionen nach wie vor unvollständig. Zentrales Ziel dieser Arbeit war es daher, zelluläre Reaktionen peripherer (Thermosensoren) und zentraler (OVLТ und MnPO) Strukturen des Thermoregulationssystems der Säuger gegenüber PGE₂ und PGD₂ zu untersuchen.

Der erste Teil dieser Arbeit beinhaltet Messungen intrazellulärer Ca²⁺-Konzentrationen in Primärkulturen von Neuronen aus Spinalganglien. Diese wurden mit dem Pyrogen PGE₂, mit dem antipyretischen Faktor PGD₂, mit einer Mischung aus PGE₂ und PGD₂ und mit Menthol, einem Aktivator von Kältesensoren, stimuliert. Die Ca²⁺-Messung erfolgte mittels Fura-2-abhängigem Ca²⁺-Imaging. Die Neurone der Spinalganglien konnten gemäß ihres Durchmessers in drei Gruppen eingeteilt werden: kleine Neurone (ca. 15 µm Durchmesser), mittelgroße Neurone (ca. 35 µm Durchmesser) und große Neurone (ca. 55 µm Durchmesser). 96 von 264 untersuchten Neuronen reagierten auf eine Stimulation mit PGE₂ mit markanten Ca²⁺-Signalen. 53 dieser 96 Neurone reagierten auch auf Menthol, was sie als Kältesensoren charakterisierte. 80% dieser Neurone gehörten der mittelgroßen Population (ca. 35 µm Durchmesser) an. In einer weiteren Versuchsreihe untersuchten wir, ob die Stärke der PGE₂-induzierten Ca²⁺-Signale durch PGD₂ moduliert wurde. In der Tat wurde in 60% der diesbezüglich untersuchten Neurone (n = 57) beobachtet, dass die Stärke der PGE₂-induzierten Ca²⁺-Signale durch Co-Stimulation mit PGD₂ reduziert wurde. Dieser Effekt war auch in der Gruppe der PGE₂- und Menthol-responsiven Zellen zu beobachten. Diese Befunde zeigen, dass es antagonistische Effekte von PGE₂ und PGD₂ auf einen neuronal getragenen Signalweg gibt, der über eine Aktivierung peripherer Kältesensoren inflammatorische Signale zum ZNS weiterleitet. Die Ergebnisse liefern auch eine mögliche alternative Erklärung für die in der Literatur beschriebenen antipyretischen und anti-inflammatorischen Eigenschaften von PGD₂.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden Effekte von PGE₂ und PGD₂ auf zentralnervöse Strukturen des Thermoregulationssystems untersucht. Im Rahmen peripherer Entzündungsreaktionen zeigt die Induktion der Enzyme, welche für die Bildung von

PGE₂ zuständig sind, einen charakteristischen Zeitverlauf in peripheren Organen und im Gehirn. In Bezug zur Fieberreaktion legt dieser Zeitverlauf nahe, dass peripher gebildetes PGE₂ für die Induktion der kürzeren, frühen Fieberphase zuständig ist, während zentral gebildetes PGE₂ die längere, späte Fieberphase im Bereich des MnPO vermittelt. Die Beeinflussung des Gehirns durch peripher gebildetes PGE₂ könnte im Bereich des OVLT erfolgen, welches eine unvollständige Blut-Hirn-Schranke aufweist und für die Fieberentstehung von Bedeutung ist. Die Wirkung von PGE₂ im MnPO könnte die Glutamat-getragene Aktivierung einer Neuronenpopulation sein, die auch durch periphere Kältesignale aktiviert wird. Unter Verwendung des Fura-2-abhängigem Ca²⁺-Imaging wurden Veränderungen intrazellulärer Ca²⁺-Konzentrationen in Zellen neuroglialer Primärkulturen des OVLT und des MnPO der Ratte gemessen. Die Kulturen beider Strukturen wurden mit PGE₂ und / oder Glutamat stimuliert. Im Gegensatz zum MnPO reagierten zahlreiche Zellen des OVLT direkt auf PGE₂ mit vorübergehenden Anstiegen intrazellulärer Ca²⁺-Konzentrationen. Im Einzelnen waren es 8% von 385 untersuchten Neuronen, 19% von 645 untersuchten Astrozyten und 28% von 43 untersuchten Mikrogliazellen. Im MnPO wurden dagegen modulatorische Wirkungen von PGE₂ auf die Stärke Glutamat-induzierter Ca²⁺-Signale nachgewiesen. In 72 von 512 untersuchten Neuronen und in 105 von 712 untersuchten Astrozyten war eine signifikante Verstärkung Glutamat-induzierter Ca²⁺-Signale zu verzeichnen. Von der Neuronenpopulation die auf diese Weise reagierte, verwendeten ca. 30% GABA als Neurotransmitter. Diese Befunde stehen im Einklang mit einer Funktion von PGE₂ als zirkulierender Botenstoff, der das Gehirn auf der Ebene des OVLT beeinflusst und von lokal im MnPO gebildetem PGE₂ als Verstärker glutamaterger sympathischer Übertragung. Speziell durch die Wirkung im MnPO wird eine Enthemmung thermoregulatorischer Wärmebildung hervorgerufen, die zur Fieberentstehung beitragen kann. In einer letzten Versuchsreihe wurde die Auswirkung einer Inkubation von OVLT und MnPO Primärkulturen mit PGE₂ und PGD₂ auf die LPS-induzierte Bildung von Zytokinen (TNF- α und IL-6) untersucht. In Primärkulturen beider Hirnstrukturen reduzierte die Inkubation mit PGE₂ die LPS-induzierte Freisetzung beider Zytokine (besonders TNF- α) in den Kulturüberstand. Im Gehirn scheint PGE₂ somit als Feedback-Signal zu wirken, das die Stärke neuroinflammatorischer Prozesse limitiert und somit eine duale Rolle mit pro- und anti-inflammatorischen Eigenschaften spielt.

G. SUMMARY

Although a crucial role for PGE₂ in the manifestation of fever and other symptoms of illness is well established, the knowledge about the sites of action and the precise cellular effects of this substance is still incomplete. The central goal of this study was therefore to study cellular responses to PGE₂ and PGD₂ of peripheral (thermosensors) and central (OVLT and MnPO) structures of the mammalian thermoregulatory system.

In a first study we measured intracellular Ca²⁺-concentrations in cultured neurones from rat dorsal root ganglia (DRG) stimulated with the pyrogenic mediator prostaglandin E₂ (PGE₂), the anti-inflammatory and antipyretic mediator PGD₂, mixtures of both PGs, and menthol using the fura-2 ratio imaging technique. Neurons could be grouped according to their size with diameters of about 15 µm (small), 35 µm (medium sized), or 55 µm (large). 96 out of 264 neurons responded to PGE₂ with pronounced Ca²⁺-signals, 53 of them being also responsive to menthol, indicative of their function as cold-sensors. 80% of these neurons belonged to the medium sized group. In a next experiment we tested whether Ca²⁺-signals of PGE₂ responsive neurons were modulated by PGD₂. In 60% of all neurons investigated (n = 57) the strength of the PGE₂-induced Ca²⁺-signals was reduced by co-administration of PGD₂. This effect was also observed in those neurons that were responsive to PGE₂ and menthol (n=23; p< 0.001). This observation indicates antagonistic effects of PGE₂ and PGD₂ on a neuronal pathway that involves cold sensors and is activated during a localized subcutaneous inflammation. This finding might provide an explanation for the reported antipyretic and anti-inflammatory capacities of PGD₂.

In a second study effects of PGE₂ and PGD₂ on central structures of the thermoregulatory system were investigated. The time course of the induction of enzymes responsible for the formation of PGE₂ after an inflammatory insult, in relation to the concomitant febrile response, suggests that peripherally generated PGE₂ is involved in the induction of the early phase of fever. Centrally produced PGE₂ exerts pyrogenic capacities during the later stages of fever within the hypothalamic median preoptic nucleus (MnPO). The actions of peripherally derived PGE₂ on the brain might occur at the level of the *organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT), which lacks a tight blood-brain barrier and is implicated in fever, while the effects of PGE₂ within the MnPO might interfere with

glutamatergic neurotransmission within a recently characterized central efferent pathway for the activation of cold-defence reactions. Using the fura-2 ratio imaging technique we, therefore, measured changes of the intracellular Ca^{2+} concentration in primary neuroglial microcultures of rat OVLT and MnPO stimulated with PGE_2 and / or glutamate. In cultures from the OVLT, as opposed to those derived from the MnPO, substantial numbers of neurons (8% of 385), astrocytes (19% of 645) and microglial cells (28% of 43) directly responded to PGE_2 with a transient increase of intracellular Ca^{2+} . The most pronounced effect of PGE_2 on cells from MnPO microcultures was its modulatory influence on the strength of glutamate-induced Ca^{2+} signals. In 72 out of 512 neurons and in 105 out of 715 astrocytes PGE_2 significantly augmented glutamate-induced Ca^{2+} signals. About 30% of these neurons were GABAergic. These observations are in agreement with putative roles of peripheral PGE_2 as a directly acting circulating agent at the level of the OVLT, and of central MnPO-intrinsic PGE_2 as an enhancer of glutamatergic neurotransmission, which causes disinhibition of thermogenic heat production, a crucial component for the manifestation of fever. In microcultures from both brain sites investigated incubation with PGE_2 or PGD_2 significantly reduced the lipopolysaccharide-induced release of cytokines ($\text{TNF-}\alpha$ and IL-6) into the supernatant. PGE_2 , thus, seems to be involved in a negative feed-back loop to limit the strength of the brain inflammatory process and to play a dual role with pro- as well as anti-inflammatory properties.

H. LITERATUR

- Aarden, L. A.; De Groot, E. R.; Schaap, O. L.; Lansdorp, P. M.** (1987): Production of hybridoma growth factor by human monocytes. *Eur J Immunol* 17 (10), S. 1411–1416.
- Aderem, A.; Ulevitch, R. J.** (2000): Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406 (6797), S. 782–787.
- Ajuebor, M. N.; Singh, A.; Wallace, J. L.** (2000): Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin D(2) is an early anti-inflammatory signal in experimental colitis. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 279 (1), G238–44.
- Almeida, M. C.; Hew-Butler, T.; Soriano, R. N.; Rao, S.; Wang, W.; Wang, J. et al.** (2012): Pharmacological blockade of the cold receptor TRPM8 attenuates autonomic and behavioral cold defenses and decreases deep body temperature. *J. Neurosci.* 32 (6), S. 2086–2099.
- Amano, H.; Hayashi, I.; Endo, H.; Kitasato, H.; Yamashina, S.; Maruyama, T. et al.** (2003): Host prostaglandin E(2)-EP3 signaling regulates tumor-associated angiogenesis and tumor growth. *J. Exp. Med.* 197 (2), S. 221–232.
- Ayoub, S. S.; Botting, R. M.; Goorha, S.; Colville-Nash, P. R.; Willoughby, D. A.; Ballou, L. R.** (2004): Acetaminophen-induced hypothermia in mice is mediated by a prostaglandin endoperoxide synthase 1 gene-derived protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (30), S. 11165–11169.
- Ayoub, S. S.; Wood, E. G.; Hassan, S. U.; Bolton, C.** (2011): Cyclooxygenase expression and prostaglandin levels in central nervous system tissues during the course of chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]* 60 (10), S. 919–928.
- Babes, A.; Zorzon, D.; Reid, G.** (2004): Two populations of cold-sensitive neurons in rat dorsal root ganglia and their modulation by nerve growth factor. *Eur. J. Neurosci.* 20 (9), S. 2276–2282.

- Barnes, P. J.; Karin, M.** (1997): Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *The New England journal of medicine* 336 (15), S. 1066–1071.
- Bastos-Pereira, A. L.; Fraga, D.; Ott, D.; Simm, B.; Murgott, J.; Roth, J.; Zampronio, A. R.** (2014): Involvement of brain cytokines in zymosan-induced febrile response. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 116 (9), S. 1220–1229.
- Baylor, S. M.; Hollingworth, S.** (2000): Measurement and Interpretation of Cytoplasmic [Ca²⁺] Signals From Calcium-Indicator Dyes. *Physiology* 15 (1), S. 19–26.
- Beeson, P. B.** (1948): Temperature-elevating effect of a substance obtained from polymorphonuclear leucocytes. *The Journal of clinical investigation* 27 (4), S. 524.
- Berridge, M. J.; Lipp, P.; Bootman, M. D.** (2000): The versatility and universality of calcium signalling. *Nature reviews. Molecular cell biology* 1 (1), S. 11–21.
- Berridge, M. V.; Tan, A. S.** (1993): Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys* 303 (2), S. 474–482.
- Beutler, B. A.** (2009): TLRs and innate immunity. *Blood* 113 (7), S. 1399–1407.
- Bizzi, A.; Garattini, S.; Veneroni, E.** (1965): The action of salicylate in reducing plasma free fatty acids and its pharmacological consequences. *British journal of pharmacology and chemotherapy* 25 (1), S. 187–196.
- Blasius, A. L.; Beutler, B.** (2010): Intracellular toll-like receptors. *Immunity* 32 (3), S. 305–315.
- Blatteis, C. M.** (1992): Role of the OVLT in the febrile response to circulating pyrogens. *Progress in brain research* 91, S. 409–412.
- Blatteis, C. M.** (2006): Endotoxic fever: new concepts of its regulation suggest new approaches to its management. *Pharmacology & therapeutics* 111 (1), S. 194–223.

- Blatteis, C. M.; Bealer, S. L.; Hunter, W. S.; Llanos-Q, J.; Ahokas, R. A.;**
Mashburn, T A Jr (1983): Suppression of fever after lesions of the anteroventral third ventricle in guinea pigs. *Brain Res Bull* 11 (5), S. 519–526.
- Blatteis, C. M.; Hunter, W. S.; Wright, J. M.; Ahokas, R. A.; Llanos-Q, J.;**
Mashburn, T. A., JR (1987): Thermoregulatory responses of guinea pigs with anteroventral third ventricle lesions. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 65 (6), S. 1261–1266.
- Blatteis, C. M.; Sehic, E.** (1997): Circulating pyrogen signaling of the brain. A new working hypothesis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 813, S. 445–447.
- Bligh, J.** (1979): The central neurology of mammalian thermoregulation. *Neuroscience* 4 (9), S. 1213–1216.
- Bligh, J.** (2006): A theoretical consideration of the means whereby the mammalian core temperature is defended at a null zone. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 100 (4), S. 1332–1337.
- Bos, C. L.; Richel, D. J.; Ritsema, T.; Peppelenbosch, M. P.; Versteeg, H. H.**
(2004): Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. *The international journal of biochemistry & cell biology* 36 (7), S. 1187–1205.
- Botting, R.** (2004): Antipyretic therapy. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 9, S. 956–966.
- Boulant, J. A.; Dean, J. B.** (1986): Temperature receptors in the central nervous system. *Annual review of physiology* 48, S. 639–654.
- Boulant, J. A.; Hardy, J. D.** (1974): The effect of spinal and skin temperatures on the firing rate and thermosensitivity of preoptic neurones. *J Physiol* 240 (3), S. 639–660.
- Bratincsák, A.; Palkovits, M.** (2004): Activation of brain areas in rat following warm and cold ambient exposure. *Neuroscience* 127 (2), S. 385–397.
- Braun, H. A.; Bade, H.; Hensel, H.** (1980): Static and dynamic discharge patterns of bursting cold fibers related to hypothetical receptor mechanisms. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 386 (1), S. 1–9.

- Brenneis, C.; Coste, O.; Altenrath, K.; Angioni, C.; Schmidt, H.; Schuh, C.-D. et al.** (2011): Anti-inflammatory role of microsomal prostaglandin E synthase-1 in a model of neuroinflammation. *J. Biol. Chem.* 286 (3), S. 2331–2342.
- Bret-Dibat, J. L.; Bluthé, R. M.; Kent, S.; Kelley, K. W.; Dantzer, R.** (1995): Lipopolysaccharide and interleukin-1 depress food-motivated behavior in mice by a vagal-mediated mechanism. *Brain, behavior, and immunity* 9 (3), S. 242–246.
- Breyer, M. D.; Breyer, R. M.** (2000): Prostaglandin receptors: their role in regulating renal function. *Current opinion in nephrology and hypertension* 9 (1), S. 23–29.
- Brück, K.; Zeisberger, E.** (1987): Adaptive changes in thermoregulation and their neuropharmacological basis. *Pharmacology & therapeutics* 35 (1-2), S. 163–215.
- Bulger, E. M.; Maier, R. V.** (2000): Lipid mediators in the pathophysiology of critical illness. *Critical care medicine* 28 (4 Suppl), N27-36.
- Cali, C.; Lopatar, J.; Petrelli, F.; Pucci, L.; Bezzi, P.** (2014): G-protein coupled receptor-evoked glutamate exocytosis from astrocytes: role of prostaglandins. *Neural Plast* 2014, S. 254574.
- Castillo, C.; Norcini, M.; Baquero-Buitrago, J.; Levacic, D.; Medina, R.; Montoya-Gacharna, J. V. et al.** (2011): The N-methyl-D-aspartate-evoked cytoplasmic calcium increase in adult rat dorsal root ganglion neuronal somata was potentiated by substance P pretreatment in a protein kinase C-dependent manner. *Neuroscience* 177, S. 308–320.
- Caterina, M. J.** (2007): Transient receptor potential ion channels as participants in thermosensation and thermoregulation. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 292 (1), R64-76.
- Chakravarty, S.; Herkenham, M.** (2005): Toll-like receptor 4 on nonhematopoietic cells sustains CNS inflammation during endotoxemia, independent of systemic cytokines. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25 (7), S. 1788–1796.
- Chandrasekharan, N. V.; Dai, H.; Roos, K. L. T.; Evanson, N. K.; Tomsik, J.; Elton, T. S.; Simmons, D. L.** (2002): COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and

- expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (21), S. 13926–13931.
- Coceani, F.; Bishai, I.; Lees, J.; Sirko, S.** (1986): Prostaglandin E2 and fever: a continuing debate. *Yale J Biol Med* 59 (2), S. 169–174.
- Coceani, F.; Lees, J.; Bishai, I.** (1988): Further evidence implicating prostaglandin E2 in the genesis of pyrogen fever. *Am. J. Physiol.* 254 (3 Pt 2), S. 9.
- Conti, B.; Tabarean, I.; Andrei, C.; Bartfai, T.** (2004): Cytokines and fever. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 9, S. 1433–1449.
- Coons, A. H.** (1958): Fluorescent antibody methods. *Gen Cytochem Methods* 1, S. 399–422.
- Craig, A. D.; Andrew, D.** (2002): Responses of spinothalamic lamina I neurons to repeated brief contact heat stimulation in the cat. *Journal of neurophysiology* 87 (4), S. 1902–1914.
- Craig, A. D.; Blomqvist, A.** (2002): Is there a specific lamina I spinothalamocortical pathway for pain and temperature sensations in primates? *The journal of pain : official journal of the American Pain Society* 3 (2), 95-101; discussion 113-4.
- Cranston, W. I.; Hellon, R. F.; Mitchell, D.** (1975): Is brain prostaglandin synthesis involved in responses to cold? *The Journal of physiology* 249 (2), S. 425–434.
- Damm, J.; Harden, L. M.; Gerstberger, R.; Roth, J.; Rummel, C.** (2013): The putative JAK-STAT inhibitor AG490 exacerbates LPS-fever, reduces sickness behavior, and alters the expression of pro- and anti-inflammatory genes in the rat brain. *Neuropharmacology* 71, S. 98–111.
- Damm, J.; Luheshi, G. N.; Gerstberger, R.; Roth, J.; Rummel, C.** (2011): Spatiotemporal nuclear factor interleukin-6 expression in the rat brain during lipopolysaccharide-induced fever is linked to sustained hypothalamic inflammatory target gene induction. *The Journal of comparative neurology* 519 (3), S. 480–505.
- Damm, J.; Wiegand, F.; Harden, L. M.; Gerstberger, R.; Rummel, C.; Roth, J.** (2012): Fever, sickness behavior, and expression of inflammatory genes in the hypothalamus after systemic and localized subcutaneous stimulation of rats with the Toll-like receptor 7 agonist imiquimod. *Neuroscience* 201, S. 166–183.

- Damm, J.; Wiegand, F.; Harden, L. M.; Wenisch, S.; Gerstberger, R.; Rummel, C.; Roth, J.** (2014): Intraperitoneal and subcutaneous injections of the TLR9 agonist ODN 1668 in rats: brain inflammatory responses are related to peripheral IL-6 rather than interferons. *Journal of neuroimmunology* 277 (1-2), S. 105–117.
- Dantzer, R.** (2004): Cytokine-induced sickness behaviour: a neuroimmune response to activation of innate immunity. *European journal of pharmacology* 500 (1-3), S. 399–411.
- Dantzer, R.; Konsman, J. P.; Bluthé, R. M.; Kelley, K. W.** (2000): Neural and humoral pathways of communication from the immune system to the brain: parallel or convergent? *Autonomic neuroscience : basic & clinical* 85 (1-3), S. 60–65.
- Dantzer, R.; O'Connor, J. C.; Freund, G. G.; Johnson, R. W.; Kelley, K. W.** (2008): From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nature reviews. Neuroscience* 9 (1), S. 46–56.
- Dewald, M.; Braun, H. A.; Huber, M. T.; Zwingmann, D.; Roth, J.; Voigt, K.** (2002): Interactions of temperature and angiotensin II in paraventricular neurons of rats in vitro. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 444 (1-2), S. 117–125.
- Dhaka, A.; Murray, A. N.; Mathur, J.; Earley, T. J.; Petrus, M. J.; Patapoutian, A.** (2007): TRPM8 is required for cold sensation in mice. *Neuron* 54 (3), S. 371–378.
- Dieter, P.; Kolada, A.; Kamionka, S.; Schadow, A.; Kaszkin, M.** (2002): Lipopolysaccharide-induced release of arachidonic acid and prostaglandins in liver macrophages: regulation by Group IV cytosolic phospholipase A2, but not by Group V and Group IIA secretory phospholipase A2. *Cellular signalling* 14 (3), S. 199–204.
- Dieter, P.; Scheibe, R.; Jakobsson, P. J.; Watanabe, K.; Kolada, A.; Kamionka, S.** (2000): Functional coupling of cyclooxygenase 1 and 2 to discrete prostanoid synthases in liver macrophages. *Biochemical and biophysical research communications* 276 (2), S. 488–492.
- Dinarello, C. A.** (1996): Thermoregulation and the pathogenesis of fever. *Infectious disease clinics of North America* 10 (2), S. 433–449.
- Dippel, D. W.; van Breda, E. J.; van der Worp, H. B.; van Gemert, H. M.; Kappelle, L. J.; Algra, A.; Koudstaal, P. J.** (2003): Timing of the effect of

acetaminophen on body temperature in patients with acute ischemic stroke.

Neurology 61 (5), S. 677–679.

Dippel, D. W.; van Breda, E. J.; van Gemert, H. M.; van der Worp, H. B.; Meijer, R. J.; Kappelle, L. J.; Koudstaal, P. J. (2001): Effect of paracetamol (acetaminophen) on body temperature in acute ischemic stroke: a double-blind, randomized phase II clinical trial. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 32 (7), S. 1607–1612.

Dulhunty, A. F. (2006): Excitation-contraction coupling from the 1950s into the new millennium. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 33 (9), S. 763–772.

Engblom, D.; Saha, S.; Engström, L.; Westman, M.; Audoly, L. P.; Jakobsson, P.-J.; Blomqvist, A. (2003): Microsomal prostaglandin E synthase-1 is the central switch during immune-induced pyresis. *Nature neuroscience* 6 (11), S. 1137–1138.

Engström, L.; Ruud, J.; Eskilsson, A.; Larsson, A.; Mackerlova, L.; Kugelberg, U. et al. (2012): Lipopolysaccharide-induced fever depends on prostaglandin E2 production specifically in brain endothelial cells. *Endocrinology* 153 (10), S. 4849–4861.

Eskilsson, A.; Tachikawa, M.; Hosoya, K.-I.; Blomqvist, A. (2014): Distribution of microsomal prostaglandin E synthase-1 in the mouse brain. *J. Comp. Neurol.* 522 (14), S. 3229–3244.

Espevik, T.; Nissen-Meyer, J. (1986): A highly sensitive cell line, WEHI 164 clone 13, for measuring cytotoxic factor/tumor necrosis factor from human monocytes. *J Immunol Methods* 95 (1), S. 99–105.

Fieren, M. W.; van den Bermd, G J; Bonta, I. L.; Ben-Efraim, S. (1991): Peritoneal macrophages from patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis have an increased capability to release tumour necrosis factor during peritonitis. *Journal of clinical & laboratory immunology* 34 (1), S. 1–9.

Flower, R. J.; Vane, J. R. (1972): Inhibition of prostaglandin synthetase in brain explains the anti-pyretic activity of paracetamol (4-acetamidophenol). *Nature* 240 (5381), S. 410–411.

Förstermann, U.; Heldt, R.; Hertting, G. (1983): Effects of intracerebroventricular administration of prostaglandin D2 on behaviour, blood pressure and body

- temperature as compared to prostaglandins E2 and F2 alpha. *Psychopharmacology (Berl.)* 80 (4), S. 365–370.
- Foster, J.; Mauger, A. R.; Chrismas, B. C.; Thomasson, K.; Taylor, L.** (2015): Is prostaglandin E2 (PGE2) involved in the thermogenic response to environmental cooling in healthy humans? *Medical hypotheses* 85 (5), S. 607–611.
- Frangakis, M. V.; Kimelberg, H. K.** (1984): Dissociation of neonatal rat brain by dispase for preparation of primary astrocyte cultures. *Neurochem Res* 9 (12), S. 1689–1698.
- Frangakis, M. V.; Koopman, W. J.; Kiyono, H.; Michalek, S. M.; McGhee, J. R.** (1982): An enzymatic method for preparation of dissociated murine Peyer's patch cells enriched for macrophages. *J Immunol Methods* 48 (1), S. 33–44.
- Gao, W.; Schmidtko, A.; Lu, R.; Brenneis, C.; Angioni, C.; Schmidt, R.; Geisslinger, G.** (2009a): Prostaglandin D(2) sustains the pyrogenic effect of prostaglandin E(2). *Eur. J. Pharmacol.* 608 (1-3), S. 28–31.
- Gao, W.; Schmidtko, A.; Wobst, I.; Lu, R.; Angioni, C.; Geisslinger, G.** (2009b): Prostaglandin D2 produced by hematopoietic prostaglandin D synthase contributes to LPS-induced fever. *J. Physiol. Pharmacol.* 60 (2), S. 145–150.
- Gebke, E.; Müller, A. R.; Jurzak, M.; Gerstberger, R.** (1998): Angiotensin II-induced calcium signalling in neurons and astrocytes of rat circumventricular organs. *Neuroscience* 85 (2), S. 509–520.
- Gebke, E.; Müller, A. R.; Pehl, U.; Gerstberger, R.** (2000): Astrocytes in sensory circumventricular organs of the rat brain express functional binding sites for endothelin. *Neuroscience* 97 (2), S. 371–381.
- Gerstberger, R.; Muller, A. R.; Simon-Oppermann, C.** (1992): Functional hypothalamic angiotensin II and catecholamine receptor systems inside and outside the blood-brain barrier. *Progress in brain research* 91, S. 423–433.
- Goldbach, J. M.; Roth, J.; Störr, B.; Zeisberger, E.** (1996): Repeated infusions of TNF-alpha cause attenuation of the thermal response and influence LPS fever in guinea pigs. *The American journal of physiology* 270 (4 Pt 2), R749-54.

- Goldbach, J. M.; Roth, J.; Zeisberger, E.** (1997): Fever suppression by subdiaphragmatic vagotomy in guinea pigs depends on the route of pyrogen administration. *The American journal of physiology* 272 (2 Pt 2), R675-81.
- Graeber, M. B.; Banati, R. B.; Streit, W. J.; Kreutzberg, G. W.** (1989): Immunophenotypic characterization of rat brain macrophages in culture. *Neurosci Lett* 103 (3), S. 241–246.
- Graham, L. T., Jr.; Shank, R. P.; Werman, R.; Aprison, M. H.** (1967): Distribution of some synaptic transmitter suspects in cat spinal cord: glutamic acid, aspartic acid, gamma-aminobutyric acid, glycine and glutamine. *J Neurochem* 14 (4), S. 465–472.
- Greis, A.; Murgott, J.; Gerstberger, R.; Hübschle, T.; Roth, J.** (2009): Effects of repeated injections of fibroblast-stimulating lipopeptide-1 on fever, formation of cytokines, and on the responsiveness to endotoxin in guinea-pigs. *Acta physiologica (Oxford, England)* 197 (1), S. 35–45.
- Greis, A.; Murgott, J.; Rafalzik, S.; Gerstberger, R.; Hübschle, T.; Roth, J.** (2007): Characterization of the febrile response induced by fibroblast-stimulating lipopeptide-1 in guinea pigs. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 293 (1), S. 61.
- Grynkiewicz, G.; Poenie, M.; Tsien, R. Y.** (1985): A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260 (6), S. 3440–3450.
- Güler, A. D.; Lee, H.; Iida, T.; Shimizu, I.; Tominaga, M.; Caterina, M.** (2002): Heat-evoked activation of the ion channel, TRPV4. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22 (15), S. 6408–6414.
- Hammel, H. T.** (1968): Regulation of internal body temperature. *Annu Rev Physiol* 30, S. 641–710.
- Hammel, H. T.; JACKSON, D. C.; STOLWIJK, J. A.; Hardy, J. D.; STROMME, S. B.** (1963): TEMPERATURE REGULATION BY HYPOTHALAMIC PROPORTIONAL CONTROL WITH AN ADJUSTABLE SET POINT. *Journal of applied physiology* 18, S. 1146–1154.
- Hanani, M.** (2005): Satellite glial cells in sensory ganglia: from form to function. *Brain Res Brain Res Rev* 48 (3), S. 457–476.

- Hansen, M. K.; O'Connor, K. A.; Goehler, L. E.; Watkins, L. R.; Maier, S. F.** (2001): The contribution of the vagus nerve in interleukin-1beta-induced fever is dependent on dose. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 280 (4), R929-34.
- Hansen, M. K.; Taishi, P.; Chen, Z.; Krueger, J. M.** (1998): Vagotomy blocks the induction of interleukin-1beta (IL-1beta) mRNA in the brain of rats in response to systemic IL-1beta. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18 (6), S. 2247–2253.
- Harden, L. M.; Kent, S.; Pittman, Q. J.; Roth, J.** (2015): Fever and sickness behavior: Friend or foe? *Brain, behavior, and immunity* 50, S. 322–333.
- Harden, L. M.; Rummel, C.; Laburn, H. P.; Damm, J.; Wiegand, F.; Poole, S. et al.** (2014): Critical role for peripherally-derived interleukin-10 in mediating the thermoregulatory manifestations of fever and hypothermia in severe forms of lipopolysaccharide-induced inflammation. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 466 (7), S. 1451–1466.
- Harizi, H.; Corcuff, J.-B.; Gualde, N.** (2008): Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. *Trends in molecular medicine* 14 (10), S. 461–469.
- Harre, E. M.; Roth, J.; Gerstberger, R.; Hubschle, T.** (2003): Interleukin-6 mediates lipopolysaccharide-induced nuclear STAT3 translocation in astrocytes of rat sensory circumventricular organs. *Brain Res* 980 (1), S. 151–155.
- Harré, E.-M.; Roth, J.; Pehl, U.; Kueth, M.; Gerstberger, R.; Hübschle, T.** (2002): Selected contribution: role of IL-6 in LPS-induced nuclear STAT3 translocation in sensory circumventricular organs during fever in rats. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 92 (6), S. 2657–2666.
- Harris, S. G.; Phipps, R. P.** (2002): Prostaglandin D(2), its metabolite 15-d-PGJ(2), and peroxisome proliferator activated receptor-gamma agonists induce apoptosis in transformed, but not normal, human T lineage cells. *Immunology* 105 (1), S. 23–34.
- Hatae, N.** (2003): [Cooperation of two subtypes of PGE2 receptor, Gi coupled EP3 and Gs coupled EP2 or EP4 subtype]. *Yakugaku zasshi : Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* 123 (10), S. 837–843.

- Hatae, N.; Sugimoto, Y.; Ichikawa, A.** (2002): Prostaglandin receptors: advances in the study of EP3 receptor signaling. *Journal of biochemistry* 131 (6), S. 781–784.
- Hatzelmann, T.** (2012): Immunhistochemische, zellbiologische und physiologische in vivo Untersuchungen zum Apelin. APJ-Systemin Hypothalamus und Hypophyse der Ratte.
- Hatzelmann, T.; Harden, L. M.; Roth, J.; Gerstberger, R.** (2013): Antipyretic effect of central Pyr1apelin13 on LPS-induced fever in the rat. *Regul Pept* 184, S. 6–13.
- Hayward, J. N.; Baker, M. A.** (1968): Diuretic and thermoregulatory responses to preoptic cooling in the monkey. *Am J Physiol* 214 (4), S. 843–850.
- Hellon, R.; Townsend, Y.** (1982): Mechanisms of fever. *Pharmacol Ther* 19 (2), S. 211–244.
- Hensel, H.; Zottermann, Y.** (1951): The effect of menthol on the thermoreceptors. *Acta physiologica Scandinavica* 24 (1), S. 27–34.
- Hinman, L. E.; Sammak, P. J.** (1998): Intensity modulation of pseudocolor images. *Biotechniques* 25 (1), S. 124–128.
- Hirai, H.; Tanaka, K.; Yoshie, O.; Ogawa, K.; Kenmotsu, K.; Takamori, Y. et al.** (2001): Prostaglandin D2 selectively induces chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2. *The Journal of experimental medicine* 193 (2), S. 255–261.
- Hitzel, N.** (2009): Charakterisierung ionotroper purinerger Rezeptoren im Nucleus medianus praeopticus des anterioren Hypothalamus der Ratte [Elektronische Ressource]. Zugl.: Giessen, Univ., Diss., 2009. 1. Aufl. Giessen: VVB Lauferweiler (Edition scientifique).
- Hori, Y.; Jyoyama, H.; Yamada, K.; Takagi, M.; Hirose, K.; Katori, M.** (1988): Time course analyses of kinins and other mediators in plasma exudation of rat kaolin-induced pleurisy. *European journal of pharmacology* 152 (3), S. 235–245.
- Hübschle, T.; Mutze, J.; Muhlradt, P. F.; Korte, S.; Gerstberger, R.; Roth, J.** (2006): Pyrexia, anorexia, adipsia, and depressed motor activity in rats during systemic inflammation induced by the Toll-like receptors-2 and -6 agonists MALP-2 and FSL-1. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290 (1), S. 7.

- Humpel, C.** (2015): Organotypic brain slice cultures: A review. *Neuroscience* 305, S. 86–98.
- Ibelgaufts, H.** (1994): Dictionary of cytokines. Weinheim <etc.>: VCH Verlagsgesellschaft.
- Inoue, W.; Matsumura, K.; Yamagata, K.; Takemiya, T.; Shiraki, T.; Kobayashi, S.** (2002): Brain-specific endothelial induction of prostaglandin E(2) synthesis enzymes and its temporal relation to fever. *Neuroscience research* 44 (1), S. 51–61.
- Ivanov, A. I.; Pero, R. S.; Scheck, A. C.; Romanovsky, A. A.** (2002): Prostaglandin E(2)-synthesizing enzymes in fever: differential transcriptional regulation. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 283 (5), R1104-17.
- Ivanov, A. I.; Romanovsky, A. A.** (2004): Prostaglandin E2 as a mediator of fever: synthesis and catabolism. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 9, S. 1977–1993.
- Janský, L.; Vybíral, S.; Pospíšilová, D.; Roth, J.; Dornand, J.; Zeisberger, E.; Kamínková, J.** (1995): Production of systemic and hypothalamic cytokines during the early phase of endotoxin fever. *Neuroendocrinology* 62 (1), S. 55–61.
- Joo, M.; Sadikot, R. T.** (2012): PGD synthase and PGD2 in immune response. *Mediators Inflamm.* 2012, S. 503128.
- Jurzak, M.; Muller, A. R.; Gerstberger, R.** (1995): AVP-fragment peptides induce Ca²⁺ transients in cells cultured from rat circumventricular organs. *Brain Res* 673 (2), S. 349–355.
- Jurzak, M.; Muller, A. R.; Schmid, H. A.; Gerstberger, R.** (1994): Primary culture of circumventricular organs from the rat brain lamina terminalis. *Brain Res* 662 (1-2), S. 198–208.
- Kassiotis, G.; Kollias, G.** (2001): Uncoupling the proinflammatory from the immunosuppressive properties of tumor necrosis factor (TNF) at the p55 TNF receptor level: implications for pathogenesis and therapy of autoimmune demyelination. *The Journal of experimental medicine* 193 (4), S. 427–434.

- Katafuchi, T.; Duan, S.; Take, S.; Yoshimura, M.** (2005): Modulation of glutamate-induced outward current by prostaglandin E(2) in rat dissociated preoptic neurons. *Brain research* 1037 (1-2), S. 180–186.
- Kidd, B. L.; Urban, L. A.** (2001): Mechanisms of inflammatory pain. *British journal of anaesthesia* 87 (1), S. 3–11.
- Kita, Y.; Yoshida, K.; Tokuoka, S. M.; Hamano, F.; Yamazaki, M.; Sakimura, K. et al.** (2015): Fever Is Mediated by Conversion of Endocannabinoid 2-Arachidonoylglycerol to Prostaglandin E2. *PloS one* 10 (7), e0133663.
- Kluger, M. J.** (1991): Fever: role of pyrogens and cryogens. *Physiological reviews* 71 (1), S. 93–127.
- Knorr, C.; Hübschle, T.; Murgott, J.; Mühlradt, P.; Gerstberger, R.; Roth, J.** (2008): Macrophage-activating lipopeptide-2 (MALP-2) induces a localized inflammatory response in rats resulting in activation of brain sites implicated in fever. *Brain research* 1205, S. 36–46.
- Knorr, C.; Marks, D.; Gerstberger, R.; Mühlradt, P. F.; Roth, J.; Rummel, C.** (2010): Peripheral and central cyclooxygenase (COX) products may contribute to the manifestation of brain-controlled sickness responses during localized inflammation induced by macrophage-activating lipopeptide-2 (MALP-2). *Neurosci. Lett.* 479 (2), S. 107–111.
- Koenig, S.; Luheshi, G. N.; Wenz, T.; Gerstberger, R.; Roth, J.; Rummel, C.** (2014): Leptin is involved in age-dependent changes in response to systemic inflammation in the rat. *Brain, behavior, and immunity* 36, S. 128–138.
- Konsman, J. P.; Luheshi, G. N.; Bluthé, R. M.; Dantzer, R.** (2000): The vagus nerve mediates behavioural depression, but not fever, in response to peripheral immune signals; a functional anatomical analysis. *The European journal of neuroscience* 12 (12), S. 4434–4446.
- Konsman, J. P.; Parnet, P.; Dantzer, R.** (2002): Cytokine-induced sickness behaviour: mechanisms and implications. *Trends in neurosciences* 25 (3), S. 154–159.
- Konsman, J. P.; Vignes, S.; Mackerlova, L.; Bristow, A.; Blomqvist, A.** (2004): Rat brain vascular distribution of interleukin-1 type-1 receptor immunoreactivity:

- relationship to patterns of inducible cyclooxygenase expression by peripheral inflammatory stimuli. *The Journal of comparative neurology* 472 (1), S. 113–129.
- Kopp, M. D.; Meissl, H.; Dehghani, F.; Korf, H. W.** (2001): The pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide modulates glutamatergic calcium signalling: investigations on rat suprachiasmatic nucleus neurons. *Journal of neurochemistry* 79 (1), S. 161–171.
- Kotani, M.; Tanaka, I.; Ogawa, Y.; Usui, T.; Mori, K.; Ichikawa, A. et al.** (1995): Molecular cloning and expression of multiple isoforms of human prostaglandin E receptor EP3 subtype generated by alternative messenger RNA splicing: multiple second messenger systems and tissue-specific distributions. *Molecular pharmacology* 48 (5), S. 869–879.
- Kozak, W.; Soszynski, D.; Rudolph, K.; Leon, L. R.; Conn, C. A.; Kluger, M. J.** (1997): Soluble tumor necrosis factor alpha receptor prevents decrease of body temperature in mice treated with indomethacin and lipopolysaccharide. *Annals of the New York Academy of Sciences* 813, S. 264–271.
- Krall, C. M.; Yao, X.; Hass, M. A.; Feleder, C.; Steiner, A. A.** (2010): Food deprivation alters thermoregulatory responses to lipopolysaccharide by enhancing cryogenic inflammatory signaling via prostaglandin D2. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 298 (6), S. 21.
- Kudo, I.; Murakami, M.** (2002): Phospholipase A2 enzymes. *Prostaglandins & other lipid mediators* 68-69, S. 3–58.
- Kunikata, T.; Yamane, H.; Segi, E.; Matsuoka, T.; Sugimoto, Y.; Tanaka, S. et al.** (2005): Suppression of allergic inflammation by the prostaglandin E receptor subtype EP3. *Nature immunology* 6 (5), S. 524–531.
- Kunkel, S. L.; Wiggins, R. C.; Chensue, S. W.; Larrick, J.** (1986): Regulation of macrophage tumor necrosis factor production by prostaglandin E2. *Biochemical and biophysical research communications* 137 (1), S. 404–410.
- Lacroix, A.; Toussay, X.; Anenberg, E.; Lecrux, C.; Ferreirós, N.; Karagiannis, A. et al.** (2015): COX-2-Derived Prostaglandin E2 Produced by Pyramidal Neurons Contributes to Neurovascular Coupling in the Rodent Cerebral Cortex. *The Journal*

of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 35 (34), S. 11791–11810.

- Laflamme, N.; Rivest, S.** (2001): Toll-like receptor 4: the missing link of the cerebral innate immune response triggered by circulating gram-negative bacterial cell wall components. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15 (1), S. 155–163.
- Lansdorp, P. M.; Aarden, L. A.; Calafat, J.; Zeiljemaker, W. P.** (1986): A growth-factor dependent B-cell hybridoma. *Curr Top Microbiol Immunol* 132, S. 105–113.
- Lazarus, M.** (2006): The differential role of prostaglandin E2 receptors EP3 and EP4 in regulation of fever. *Mol Nutr Food Res* 50 (4-5), S. 451–455.
- Lazarus, M.; Yoshida, K.; Coppari, R.; Bass, C. E.; Mochizuki, T.; Lowell, B. B.; Saper, C. B.** (2007): EP3 prostaglandin receptors in the median preoptic nucleus are critical for fever responses. *Nat. Neurosci.* 10 (9), S. 1131–1133.
- Leon, L. R.** (2002): Invited review: cytokine regulation of fever: studies using gene knockout mice. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 92 (6), S. 2648–2655.
- Li, S.; Dou, W.; Tang, Y.; Goorha, S.; Ballou, L. R.; Blatteis, C. M.** (2008): Acetaminophen: antipyretic or hypothermic in mice? In either case, PGHS-1b (COX-3) is irrelevant. *Prostaglandins & other lipid mediators* 85 (3-4), S. 89–99.
- Li, S.; Wang, Y.; Matsumura, K.; Ballou, L. R.; Morham, S. G.; Blatteis, C. M.** (1999): The febrile response to lipopolysaccharide is blocked in cyclooxygenase-2(-/-), but not in cyclooxygenase-1(-/-) mice. *Brain research* 825 (1-2), S. 86–94.
- Li, Z.; Perlik, V.; Feleder, C.; Tang, Y.; Blatteis, C. M.** (2006): Kupffer cell-generated PGE2 triggers the febrile response of guinea pigs to intravenously injected LPS. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 290 (5), R1262-70.
- Linte, R. M.; Ciobanu, C.; Reid, G.; Babes, A.** (2007): Desensitization of cold- and menthol-sensitive rat dorsal root ganglion neurones by inflammatory mediators. *Exp Brain Res* 178 (1), S. 89–98.

- Liu, H.; Li, W.; Rose, M. E.; Pascoe, J. L.; Miller, T. M.; Ahmad, M. et al. (2013):** Prostaglandin D2 toxicity in primary neurons is mediated through its bioactive cyclopentenone metabolites. *Neurotoxicology* 39, S. 35–44.
- Lu, K. P.; Means, A. R. (1993):** Regulation of the cell cycle by calcium and calmodulin. *Endocr Rev* 14 (1), S. 40–58.
- Luheshi, G. N.; Bluthé, R. M.; Rushforth, D.; Mulcahy, N.; Konsman, J. P.; Goldbach, M.; Dantzer, R. (2000):** Vagotomy attenuates the behavioural but not the pyrogenic effects of interleukin-1 in rats. *Autonomic neuroscience : basic & clinical* 85 (1-3), S. 127–132.
- Malgaroli, A.; Milani, D.; Meldolesi, J.; Pozzan, T. (1987):** Fura-2 measurement of cytosolic free Ca²⁺ in monolayers and suspensions of various types of animal cells. *J Cell Biol* 105 (5), S. 2145–2155.
- Malin, S. A.; Davis, B. M.; Molliver, D. C. (2007):** Production of dissociated sensory neuron cultures and considerations for their use in studying neuronal function and plasticity. *Nature protocols* 2 (1), S. 152–160.
- Martich, G. D.; Danner, R. L.; Ceska, M.; Suffredini, A. F. (1991):** Detection of interleukin 8 and tumor necrosis factor in normal humans after intravenous endotoxin: the effect of antiinflammatory agents. *The Journal of experimental medicine* 173 (4), S. 1021–1024.
- Masli, S.; Turpie, B. (2009):** Anti-inflammatory effects of tumour necrosis factor (TNF)-alpha are mediated via TNF-R2 (p75) in tolerogenic transforming growth factor-beta-treated antigen-presenting cells. *Immunology* 127 (1), S. 62–72.
- Matsuda, T.; Hori, T.; Nakashima, T. (1992):** Thermal and PGE2 sensitivity of the organum vasculosum lamina terminalis region and preoptic area in rat brain slices. *The Journal of physiology* 454, S. 197–212.
- Matsumura, K.; Kobayashi, S. (2004):** Signaling the brain in inflammation: the role of endothelial cells. *Front. Biosci.* 9, S. 2819–2826.
- Matsumura, K.; Watanabe, Y.; Onoe, H.; Hayaishi, O. (1990):** High density of prostaglandin E2 binding sites in the anterior wall of the 3rd ventricle: a possible site of its hyperthermic action. *Brain Res.* 533 (1), S. 147–151.

- Mauger, A. R.; Taylor, L.; Harding, C.; Wright, B.; Foster, J.; Castle, P. C. (2014):** Acute acetaminophen (paracetamol) ingestion improves time to exhaustion during exercise in the heat. *Experimental physiology* 99 (1), S. 164–171.
- McAdam, B. F.; Mardini, I. A.; Habib, A.; Burke, A.; Lawson, J. A.; Kapoor, S.; FitzGerald, G. A. (2000):** Effect of regulated expression of human cyclooxygenase isoforms on eicosanoid and isoeicosanoid production in inflammation. *The Journal of clinical investigation* 105 (10), S. 1473–1482.
- McAllen, R. M.; Tanaka, M.; Ootsuka, Y.; McKinley, M. J. (2010):** Multiple thermoregulatory effectors with independent central controls. *European journal of applied physiology* 109 (1), S. 27–33.
- McCusker, R. H.; Kelley, K. W. (2013):** Immune-neural connections: how the immune system's response to infectious agents influences behavior. *The Journal of experimental biology* 216 (Pt 1), S. 84–98.
- McKemy, D. D.; Neuhausser, W. M.; Julius, D. (2002):** Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* 416 (6876), S. 52–58.
- McKinley, Gerstberger; Mathai; Oldfield; Schmid (1999):** The lamina terminalis and its role in fluid and electrolyte homeostasis. *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia* 6 (4), S. 289–301.
- Milton, A. S. (1998):** Prostaglandins and fever. *Prog Brain Res* 115, S. 129–139.
- Milton, A. S.; Wendlandt, S. (1971):** Effects on body temperature of prostaglandins of the A, E and F series on injection into the third ventricle of unanaesthetized cats and rabbits. *J. Physiol. (Lond.)* 218 (2), S. 325–336.
- Mizoguchi, A.; Eguchi, N.; Kimura, K.; Kiyohara, Y.; Qu, W. M.; Huang, Z. L. et al. (2001):** Dominant localization of prostaglandin D receptors on arachnoid trabecular cells in mouse basal forebrain and their involvement in the regulation of non-rapid eye movement sleep. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (20), S. 11674–11679.
- Mogensen, T. H. (2009):** Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clinical microbiology reviews* 22 (2), 240-73, Table of Contents.

- Morrison, S. F.; Nakamura, K.** (2011): Central neural pathways for thermoregulation. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* 16, S. 74–104.
- Mosmann, T.** (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65 (1-2), S. 55–63.
- Mouihate, A.; Boissé, L.; Pittman, Q. J.** (2004): A novel antipyretic action of 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 in the rat brain. *J. Neurosci.* 24 (6), S. 1312–1318.
- Mullis, K. B.; Faloona, F. A.** (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155, S. 335–350.
- Murakami, M.; Kudo, I.** (2001): Diversity and regulatory functions of mammalian secretory phospholipase A2s. *Advances in immunology* 77, S. 163–194.
- Murakami, M.; Nakatani, Y.; Atsumi, G.; Inoue, K.; Kudo, I.** (1997): Regulatory functions of phospholipase A2. *Critical reviews in immunology* 17 (3-4), S. 225–283.
- Nagase, T.; Uozumi, N.; Aoki-Nagase, T.; Terawaki, K.; Ishii, S.; Tomita, T. et al.** (2003): A potent inhibitor of cytosolic phospholipase A2, arachidonyl trifluoromethyl ketone, attenuates LPS-induced lung injury in mice. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 284 (5), L720-6.
- Nagashima, K.; Nakai, S.; Tanaka, M.; Kanosue, K.** (2000): Neuronal circuitries involved in thermoregulation. *Autonomic neuroscience : basic & clinical* 85 (1-3), S. 18–25.
- Nakamura, K.** (2011): Central circuitries for body temperature regulation and fever. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 301 (5), S. 28.
- Nakamura, K.; Kaneko, T.; Yamashita, Y.; Hasegawa, H.; Katoh, H.; Negishi, M.** (2000): Immunohistochemical localization of prostaglandin EP3 receptor in the rat nervous system. *J. Comp. Neurol.* 421 (4), S. 543–569.
- Nakamura, K.; Matsumura, K.; Hübschle, T.; Nakamura, Y.; Hioki, H.; Fujiyama, F. et al.** (2004): Identification of sympathetic premotor neurons in medullary raphe regions mediating fever and other thermoregulatory functions. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24 (23), S. 5370–5380.

- Nakamura, K.; Matsumura, K.; Kaneko, T.; Kobayashi, S.; Katoh, H.; Negishi, M.** (2002): The rostral raphe pallidus nucleus mediates pyrogenic transmission from the preoptic area. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22 (11), S. 4600–4610.
- Nakamura, K.; Morrison, S. F.** (2008a): A thermosensory pathway that controls body temperature. *Nat. Neurosci.* 11 (1), S. 62–71.
- Nakamura, K.; Morrison, S. F.** (2008b): Preoptic mechanism for cold-defensive responses to skin cooling. *J Physiol* 586 (Pt 10), S. 2611–2620.
- Nakamura, K.; Morrison, S. F.** (2011): Central efferent pathways for cold-defensive and febrile shivering. *The Journal of physiology* 589 (Pt 14), S. 3641–3658.
- Nakamura, Y.; Nakamura, K.; Matsumura, K.; Kobayashi, S.; Kaneko, T.; Morrison, S. F.** (2005): Direct pyrogenic input from prostaglandin EP3 receptor-expressing preoptic neurons to the dorsomedial hypothalamus. *The European journal of neuroscience* 22 (12), S. 3137–3146.
- Nakano, T.; Arita, H.** (1990): Enhanced expression of group II phospholipase A2 gene in the tissues of endotoxin shock rats and its suppression by glucocorticoid. *FEBS letters* 273 (1-2), S. 23–26.
- Natura, G.; Bär, K.-J.; Eitner, A.; Boettger, M. K.; Richter, F.; Hensellek, S. et al.** (2013): Neuronal prostaglandin E2 receptor subtype EP3 mediates antinociception during inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110 (33), S. 13648–13653.
- Navarro, V. P.; Iyomasa, M. M.; Leite-Panissi, C. R. A.; Almeida, M. C.; Branco, L. G. S.** (2006): New role of the trigeminal nerve as a neuronal pathway signaling brain in acute periodontitis: participation of local prostaglandins. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 453 (1), S. 73–82.
- Neher, E.; Sakaba, T.** (2008): Multiple roles of calcium ions in the regulation of neurotransmitter release. *Neuron* 59 (6), S. 861–872.
- Nijima, A.** (1996): The afferent discharges from sensors for interleukin 1 beta in the hepatoportal system in the anesthetized rat. *Journal of the autonomic nervous system* 61 (3), S. 287–291.
- Nomura, D. K.; Morrison, B. E.; Blankman, J. L.; Long, J. Z.; Kinsey, S. G.; Marcondes, Maria Cecilia G et al.** (2011): Endocannabinoid hydrolysis generates

- brain prostaglandins that promote neuroinflammation. *Science (New York, N.Y.)* 334 (6057), S. 809–813.
- Obrietan, K.; Belousov, A. B.; Heller, H. C.; van den Pol, A. N.** (1995): Adenosine pre- and postsynaptic modulation of glutamate-dependent calcium activity in hypothalamic neurons. *Journal of neurophysiology* 74 (5), S. 2150–2162.
- Oka, T.** (2004): Prostaglandin E2 as a mediator of fever: the role of prostaglandin E (EP) receptors. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 9, S. 3046–3057.
- Oka, T.; Oka, K.; Kobayashi, T.; Sugimoto, Y.; Ichikawa, A.; Ushikubi, F. et al.** (2003a): Characteristics of thermoregulatory and febrile responses in mice deficient in prostaglandin EP1 and EP3 receptors. *J. Physiol. (Lond.)* 551 (Pt 3), S. 945–954.
- Oka, T.; Oka, K.; Saper, C. B.** (2003b): Contrasting effects of E type prostaglandin (EP) receptor agonists on core body temperature in rats. *Brain research* 968 (2), S. 256–262.
- Oka, T.; Oka, K.; Scammell, T. E.; Lee, C.; Kelly, J. F.; Nantel, F. et al.** (2000): Relationship of EP(1-4) prostaglandin receptors with rat hypothalamic cell groups involved in lipopolysaccharide fever responses. *The Journal of comparative neurology* 428 (1), S. 20–32.
- Okazawa, M.; Terauchi, T.; Shiraki, T.; Matsumura, K.; Kobayashi, S.** (2000): l-Menthol-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase and impulses in cultured sensory neurons. *Neuroreport* 11 (10), S. 2151–2155.
- Ootsuka, Y.; Blessing, W. W.; McAllen, R. M.** (2004): Inhibition of rostral medullary raphé neurons prevents cold-induced activity in sympathetic nerves to rat tail and rabbit ear arteries. *Neuroscience letters* 357 (1), S. 58–62.
- Ootsuka, Y.; Blessing, W. W.; Steiner, A. A.; Romanovsky, A. A.** (2008): Fever response to intravenous prostaglandin E2 is mediated by the brain but does not require afferent vagal signaling. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 294 (4), R1294-303.
- Ootsuka, Y.; McAllen, R. M.** (2005): Interactive drives from two brain stem premotor nuclei are essential to support rat tail sympathetic activity. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 289 (4), R1107-15.

- Ott, D.; Murgott, J.; Rafalzik, S.; Wuchert, F.; Schmalenbeck, B.; Roth, J.; Gerstberger, R.** (2010): Neurons and glial cells of the rat organum vasculosum laminae terminalis directly respond to lipopolysaccharide and pyrogenic cytokines. *Brain Res* 1363, S. 93–106.
- Ott, D.; Wuchert, F.; Murgott, J.; Rummel, C.; Gerstberger, R.; Roth, J.** (2012): The viral mimetic polyinosinic:polycytidylic acid (poly I:C) induces cellular responses in primary cultures from rat brain sites with an incomplete blood-brain barrier. *Neurosci Lett* 530 (1), S. 64–68.
- Paredes, R. M.; Etzler, J. C.; Watts, L. T.; Zheng, W.; Lechleiter, J. D.** (2008): Chemical calcium indicators. *Methods* 46 (3), S. 143–151.
- Pecchi, E.; Dallaporta, M.; Jean, A.; Thirion, S.; Troadec, J.-D.** (2009): Prostaglandins and sickness behavior: old story, new insights. *Physiol. Behav.* 97 (3-4), S. 279–292.
- Peier, A. M.; Moqrich, A.; Hergarden, A. C.; Reeve, A. J.; Andersson, D. A.; Story, G. M. et al.** (2002): A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* 108 (5), S. 705–715.
- Perlik, V.; Li, Z.; Goorha, S.; Ballou, L. R.; Blatteis, C. M.** (2005): LPS-activated complement, not LPS per se, triggers the early release of PGE2 by Kupffer cells. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 289 (2), R332-R339.
- Pierau, F. K.; Torrey, P.; Carpenter, D. O.** (1974): Mammalian cold receptor afferents: role of an electrogenic sodium pump in sensory transduction. *Brain research* 73 (1), S. 156–160.
- Poenie, M.; Tsien, R.** (1986): Fura-2: a powerful new tool for measuring and imaging Ca²⁺ in single cells. *Prog Clin Biol Res* 210, S. 53–56.
- Quan, N.** (2008): Immune-to-brain signaling: how important are the blood-brain barrier-independent pathways? *Molecular neurobiology* 37 (2-3), S. 142–152.
- Quan, N.; Banks, W. A.** (2007): Brain-immune communication pathways. *Brain, behavior, and immunity* 21 (6), S. 727–735.

- Quirion, R.; Dalpe, M.; Dam, T. V.** (1986): Characterization and distribution of receptors for the atrial natriuretic peptides in mammalian brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (1), S. 174–178.
- Rajakariar, R.; Hilliard, M.; Lawrence, T.; Trivedi, S.; Colville-Nash, P.; Bellingan, G. et al.** (2007): Hematopoietic prostaglandin D2 synthase controls the onset and resolution of acute inflammation through PGD2 and 15-deoxyDelta12 14 PGJ2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (52), S. 20979–20984.
- Ranels, H. J.; Griffin, J. D.** (2003): The effects of prostaglandin E2 on the firing rate activity of thermosensitive and temperature insensitive neurons in the ventromedial preoptic area of the rat hypothalamus. *Brain research* 964 (1), S. 42–50.
- Reid, G.; Babes, A.; Pluteanu, F.** (2002): A cold- and menthol-activated current in rat dorsal root ganglion neurones: properties and role in cold transduction. *J. Physiol. (Lond.)* 545 (Pt 2), S. 595–614.
- Reid, G.; Flonta, M. L.** (2001): Physiology. Cold current in thermoreceptive neurons. *Nature* 413 (6855), S. 480.
- Reid, G.; Flonta, M.-L.** (2002): Ion channels activated by cold and menthol in cultured rat dorsal root ganglion neurones. *Neuroscience letters* 324 (2), S. 164–168.
- Ricote, M.; Li, A. C.; Willson, T. M.; Kelly, C. J.; Glass, C. K.** (1998): The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 391 (6662), S. 79–82.
- Riediger, T.; Schmid, H. A.; Lutz, T.; Simon, E.** (2001): Amylin potently activates AP neurons possibly via formation of the excitatory second messenger cGMP. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 281 (6), R1833-43.
- Rollstin, A. D.; Seifert, S. A.** (2013): Acetaminophen/diphenhydramine overdose in profound hypothermia. *Clinical toxicology (Philadelphia, Pa.)* 51 (1), S. 50–53.
- Romanovsky, A. A.** (2004): Signaling the brain in the early sickness syndrome: are sensory nerves involved? *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 9, S. 494–504.

- Romanovsky, A. A.** (2007): Thermoregulation: some concepts have changed. Functional architecture of the thermoregulatory system. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 292 (1), R37-46.
- Romanovsky, A. A.; Ivanov, A. I.; Karman, E. K.** (1999): Blood-borne, albumin-bound prostaglandin E2 may be involved in fever. *The American journal of physiology* 276 (6 Pt 2), R1840-4.
- Romanovsky, A. A.; Steiner, A. A.; Matsumura, K.** (2006): Cells that trigger fever. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 5 (19), S. 2195–2197.
- Romanovsky, A. A.; Sugimoto, N.; Simons, C. T.; Hunter, W. S.** (2003): The organum vasculosum laminae terminalis in immune-to-brain febrigenic signaling: a reappraisal of lesion experiments. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 285 (2), R420-8.
- Rosenberger, T. A.; Villacreses, N. E.; Contreras, M. A.; Bonventre, J. V.; Rapoport, S. I.** (2003): Brain lipid metabolism in the cPLA2 knockout mouse. *Journal of lipid research* 44 (1), S. 109–117.
- Ross, G.; Hübschle, T.; Pehl, U.; Braun, H.-A.; Voigt, K.; Gerstberger, R.; Roth, J.** (2003): Fever induction by localized subcutaneous inflammation in guinea pigs: the role of cytokines and prostaglandins. *J. Appl. Physiol.* 94 (4), S. 1395–1402.
- Ross, G.; Roth, J.; Störr, B.; Voigt, K.; Zeisberger, E.** (2000): Afferent nerves are involved in the febrile response to injection of LPS into artificial subcutaneous chambers in guinea pigs. *Physiol. Behav.* 71 (3-4), S. 305–313.
- Rossbach, K.; Nassenstein, C.; Gschwandtner, M.; Schnell, D.; Sander, K.; Seifert, R. et al.** (2011): Histamine H1, H3 and H4 receptors are involved in pruritus. *Neuroscience* 190, S. 89–102.
- Roth, J.** (2006): Endogenous antipyretics. *Clin. Chim. Acta* 371 (1-2), S. 13–24.
- Roth, J.** (2015): Who is the gatekeeper to let inflammation enter the brain? A concerted action of endothelial and perivascular cells. *Brain, behavior, and immunity* 48, S. 29–30.
- Roth, J.; Blatteis, C. M.** (2014): Mechanisms of fever production and lysis: lessons from experimental LPS fever. *Comprehensive Physiology* 4 (4), S. 1563–1604.

- Roth, J.; De Souza, G. E.** (2001): Fever induction pathways: evidence from responses to systemic or local cytokine formation. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 34 (3), S. 301–314.
- Roth, J.; Harré, E.-M.; Rummel, C.; Gerstberger, R.; Hübschle, T.** (2004): Signaling the brain in systemic inflammation: role of sensory circumventricular organs. *Front. Biosci.* 9, S. 290–300.
- Roth, J.; Hübschle, T.; Pehl, U.; Ross, G.; Gerstberger, R.** (2002): Influence of systemic treatment with cyclooxygenase inhibitors on lipopolysaccharide-induced fever and circulating levels of cytokines and cortisol in guinea-pigs. *Pflugers Arch.* 443 (3), S. 411–417.
- Roth, J.; Zeisberger, E.** (1995): Endotoxin tolerance alters thermal response of guinea pigs to systemic infusions of tumor necrosis factor-alpha. *The American journal of physiology* 268 (2 Pt 2), R514-9.
- Rotondo, D.; Abul, H. T.; Milton, A. S.; Davidson, J.** (1988): Pyrogenic immunomodulators increase the level of prostaglandin E2 in the blood simultaneously with the onset of fever. *Eur. J. Pharmacol.* 154 (2), S. 145–152.
- Rummel, C.** (2005): Charakterisierung der Bedeutung von IL-6 und Prostaglandinen bei der Fieberentstehung nach systemischer oder lokaler Stimulation mit bakteriellem Lipopolysaccharid bei Meerschweinchen. Online verfügbar unter <http://worldcatlibraries.org/wcpa/oclc/723529121>.
- Rummel, C.; Barth, S. W.; Voss, T.; Korte, S.; Gerstberger, R.; Hübschle, T.; Roth, J.** (2005): Localized vs. systemic inflammation in guinea pigs: a role for prostaglandins at distinct points of the fever induction pathways? *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 289 (2), S. R340-R347.
- Rummel, C.; Bredehöft, J.; Damm, J.; Schweighöfer, H.; Peek, V.; Harden, L. M.** (2016): Obesity Impacts Fever and Sickness Behavior During Acute Systemic Inflammation. *Physiology (Bethesda, Md.)* 31 (2), S. 117–130.
- Rummel, C.; Hübschle, T.; Gerstberger, R.; Roth, J.** (2004): Nuclear translocation of the transcription factor STAT3 in the guinea pig brain during systemic or localized inflammation. *The Journal of physiology* 557 (Pt 2), S. 671–687.
- Russell, W. M. S.; Burch, R. L.** (1959): The principles of humane experimental technique: Methuen.

- Sanchez-Alavez, M.; Nguyen, W.; Mori, S.; Moroncini, G.; Viader, A.; Nomura, D. K. et al.** (2015): Monoacylglycerol Lipase Regulates Fever Response. *PloS one* 10 (8), e0134437.
- Sandig, H.; Pease, J. E.; Sabroe, I.** (2007): Contrary prostaglandins: the opposing roles of PGD2 and its metabolites in leukocyte function. *Journal of leukocyte biology* 81 (2), S. 372–382.
- Saper, C. B.; Romanovsky, A. A.; Scammell, T. E.** (2012): Neural circuitry engaged by prostaglandins during the sickness syndrome. *Nat. Neurosci.* 15 (8), S. 1088–1095.
- Satinoff, E.** (1972): Salicylate: action on normal body temperature in rats. *Science (New York, N.Y.)* 176 (4034), S. 532–533.
- Scammell, T. E.; Elmquist, J. K.; Griffin, J. D.; Saper, C. B.** (1996): Ventromedial preoptic prostaglandin E2 activates fever-producing autonomic pathways. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16 (19), S. 6246–6254.
- Schäfer, K.; Braun, H. A.** (1990): Modulation of periodic cold receptor activity by ouabain. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 417 (1), S. 91–99.
- Schäfer, K.; Braun, H. A.; Hensel, H.** (1982): Static and dynamic activity of cold receptors at various calcium levels. *Journal of neurophysiology* 47 (6), S. 1017–1028.
- Schäfer, K.; Braun, H. A.; Isenberg, C.** (1986): Effect of menthol on cold receptor activity. Analysis of receptor processes. *J. Gen. Physiol.* 88 (6), S. 757–776.
- Scher, J. U.; Pillinger, M. H.** (2009): The anti-inflammatory effects of prostaglandins. *J. Investig. Med.* 57 (6), S. 703–708.
- Schiltz, J. C.; Sawchenko, P. E.** (2002): Distinct brain vascular cell types manifest inducible cyclooxygenase expression as a function of the strength and nature of immune insults. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22 (13), S. 5606–5618.
- Schmid, A.; Thierauch, K. H.; Schleuning, W. D.; Dinter, H.** (1995): Splice variants of the human EP3 receptor for prostaglandin E2. *European journal of biochemistry / FEBS* 228 (1), S. 23–30.

- Schneiders, J.; Fuchs, F.; Damm, J.; Herden, C.; Gerstberger, R.; Soares, D. M. et al.** (2015): The transcription factor nuclear factor interleukin 6 mediates pro- and anti-inflammatory responses during LPS-induced systemic inflammation in mice. *Brain, behavior, and immunity* 48, S. 147–164.
- Shih, E.; Blatteis, C. M.** (1996): Blockade of lipopolysaccharide-induced fever by subdiaphragmatic vagotomy in guinea pigs. *Brain research* 726 (1-2), S. 160–166.
- Shih, E.; Székely, M.; Ungar, A. L.; Oladehin, A.; Blatteis, C. M.** (1996): Hypothalamic prostaglandin E2 during lipopolysaccharide-induced fever in guinea pigs. *Brain Res. Bull.* 39 (6), S. 391–399.
- Shibata, M.; Blatteis, C. M.** (1991): Human recombinant tumor necrosis factor and interferon affect the activity of neurons in the organum vasculosum laminae terminalis. *Brain research* 562 (2), S. 323–326.
- Simmons, D. L.; Botting, R. M.; Hla, T.** (2004): Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacological reviews* 56 (3), S. 387–437.
- Simon, E.** (1981): Effects of CNS temperature on generation and transmission of temperature signals in homeotherms. A common concept for mammalian and avian thermoregulation. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 392 (1), S. 79–88.
- Simon, E.; Pierau, F. K.; Taylor, D. C.** (1986): Central and peripheral thermal control of effectors in homeothermic temperature regulation. *Physiological reviews* 66 (2), S. 235–300.
- Simons, C. T.; Kulchitsky, V. A.; Sugimoto, N.; Homer, L. D.; Székely, M.; Romanovsky, A. A.** (1998): Signaling the brain in systemic inflammation: which vagal branch is involved in fever genesis? *The American journal of physiology* 275 (1 Pt 2), R63-8.
- Smith, J. A.; Davis, C. L.; Burgess, G. M.** (2000a): Prostaglandin E2-induced sensitization of bradykinin-evoked responses in rat dorsal root ganglion neurons is mediated by cAMP-dependent protein kinase A. *Eur J Neurosci* 12 (9), S. 3250–3258.

- Smith, W. L.; DeWitt, D. L.; Garavito, R. M.** (2000b): Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annual review of biochemistry* 69, S. 145–182.
- Smith, W. L.; Lands, W. E.** (1972): Oxygenation of polyunsaturated fatty acids during prostaglandin biosynthesis by sheep vesicular gland. *Biochemistry* 11 (17), S. 3276–3285.
- Smith, W. L.; Marnett, L. J.; DeWitt, D. L.** (1991): Prostaglandin and thromboxane biosynthesis. *Pharmacology & therapeutics* 49 (3), S. 153–179.
- Southall, M. D.; Vasko, M. R.** (2001): Prostaglandin receptor subtypes, EP3C and EP4, mediate the prostaglandin E2-induced cAMP production and sensitization of sensory neurons. *J. Biol. Chem.* 276 (19), S. 16083–16091.
- Steiner, A. A.; Antunes-Rodrigues, J.; Branco, L. G. S.** (2002): Role of preoptic second messenger systems (cAMP and cGMP) in the febrile response. *Brain research* 944 (1-2), S. 135–145.
- Steiner, A. A.; Ivanov, A. I.; Serrats, J.; Hosokawa, H.; Phayre, A. N.; Robbins, J. R. et al.** (2006): Cellular and molecular bases of the initiation of fever. *PLoS Biol.* 4 (9), S. e284.
- Steiner, A. A.; Rudaya, A. Y.; Robbins, J. R.; Dragic, A. S.; Langenbach, R.; Romanovsky, A. A.** (2005): Expanding the febrigenic role of cyclooxygenase-2 to the previously overlooked responses. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 289 (5), S. 7.
- Straus, D. S.; Pascual, G.; Li, M.; Welch, J. S.; Ricote, M.; Hsiang, C. H. et al.** (2000): 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF-kappa B signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97 (9), S. 4844–4849.
- Stucky, C. L.; Thayer, S. A.; Seybold, V. S.** (1996): Prostaglandin E2 increases the proportion of neonatal rat dorsal root ganglion neurons that respond to bradykinin. *Neuroscience* 74 (4), S. 1111–1123.
- Sugimoto, Y.; Narumiya, S.** (2007): Prostaglandin E receptors. *J. Biol. Chem.* 282 (16), S. 11613–11617.
- Tanaka, M.; McAllen, R. M.** (2005): A subsidiary fever center in the medullary raphe? *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 289 (6), R1592-8.

- Tanaka, M.; Nagashima, K.; McAllen, R. M.; Kanosue, K.** (2002): Role of the medullary raphe in thermoregulatory vasomotor control in rats. *The Journal of physiology* 540 (**Pt 2**), S. 657–664.
- Tanaka, M.; Owens, N. C.; Nagashima, K.; Kanosue, K.; McAllen, R. M.** (2006): Reflex activation of rat fusimotor neurons by body surface cooling, and its dependence on the medullary raphe. *The Journal of physiology* 572 (**Pt 2**), S. 569–583.
- Tracey, K. J.** (2002): The inflammatory reflex. *Nature* 420 (**6917**), S. 853–859.
- Tracey, K. J.** (2007): Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. *The Journal of clinical investigation* 117 (**2**), S. 289–296.
- Tracey, K. J.** (2009): Reflex control of immunity. *Nature reviews. Immunology* 9 (**6**), S. 418–428.
- Tripp, A.; Roth, J.; Störr, B.; Voigt, K.; Zeisberger, E.** (1998): Febrile tolerance develops in response to repeated administration of bacterial lipopolysaccharide but not of interleukin-1 β in rats. *Journal of Thermal Biology* 23 (**6**), S. 387–394.
- Uematsu, S.; Akira, S.** (2006): The role of Toll-like receptors in immune disorders. *Expert opinion on biological therapy* 6 (**3**), S. 203–214.
- Ueno, R.; Narumiya, S.; Ogorochi, T.; Nakayama, T.; Ishikawa, Y.; Hayaishi, O.** (1982): Role of prostaglandin D₂ in the hypothermia of rats caused by bacterial lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79 (**19**), S. 6093–6097.
- Uozumi, N.; Shimizu, T.** (2002): Roles for cytosolic phospholipase A₂ α as revealed by gene-targeted mice. *Prostaglandins & other lipid mediators* 68-69, S. 59–69.
- Urade, Y.; Hayaishi, O.** (2011): Prostaglandin D₂ and sleep/wake regulation. *Sleep medicine reviews* 15 (**6**), S. 411–418.
- Urade, Y.; Watanabe, K.; Hayaishi, O.** (1995): Prostaglandin D, E, and F synthases. *Journal of lipid mediators and cell signalling* 12 (**2-3**), S. 257–273.
- Ushikubi, F.; Hirata, M.; Narumiya, S.** (1995): Molecular biology of prostanoid receptors; an overview. *Journal of lipid mediators and cell signalling* 12 (**2-3**), S. 343–359.

- Ushikubi, F.; Segi, E.; Sugimoto, Y.; Murata, T.; Matsuoka, T.; Kobayashi, T. et al.** (1998): Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP3. *Nature* 395 (6699), S. 281–284.
- Vadas, P.; Pruzanski, W.** (1993): Induction of group II phospholipase A2 expression and pathogenesis of the sepsis syndrome. *Circulatory shock* 39 (2), S. 160–167.
- Van Oers, M. H.; Van der Heyden, A. A.; Aarden, L. A.** (1988): Interleukin 6 (IL-6) in serum and urine of renal transplant recipients. *Clin Exp Immunol* 71 (2), S. 314–319.
- Vane, J. R.** (1971): Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature: New biology* 231 (25), S. 232–235.
- Vasilache, A. M.; Andersson, J.; Nilsberth, C.** (2007): Expression of PGE2 EP3 receptor subtypes in the mouse preoptic region. *Neuroscience letters* 423 (3), S. 179–183.
- Vasilache, A. M.; Qian, H.; Blomqvist, A.** (2015): Immune challenge by intraperitoneal administration of lipopolysaccharide directs gene expression in distinct blood-brain barrier cells toward enhanced prostaglandin E(2) signaling. *Brain, behavior, and immunity* 48, S. 31–41.
- Vizin, R. C. L.; Scarpellini, C. d. S.; Ishikawa, D. T.; Correa, G. M.; Souza, C. O. de; Gargaglioni, L. H. et al.** (2015): TRPV4 activates autonomic and behavioural warmth-defence responses in Wistar rats. *Acta physiologica (Oxford, England)* 214 (2), S. 275–289.
- Wallace, J. L.** (2008): Prostaglandins, NSAIDs, and gastric mucosal protection: why doesn't the stomach digest itself? *Physiological reviews* 88 (4), S. 1547–1565.
- Watkins, L. R.; Maier, S. F.; Goehler, L. E.** (1995): Immune activation: the role of pro-inflammatory cytokines in inflammation, illness responses and pathological pain states. *PAIN* 63 (3), S. 289–302.
- Watkins, L. R.; Wiertelak, E. P.; Goehler, L. E.; Smith, K. P.; Martin, D.; Maier, S. F.** (1994): Characterization of cytokine-induced hyperalgesia. *Brain research* 654 (1), S. 15–26.
- Wechselberger, M.; Wright, C. L.; Bishop, G. A.; Boulant, J. A.** (2006): Ionic channels and conductance-based models for hypothalamic neuronal

thermosensitivity. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 291 (3), R518-29.

Welsch, J.; Hübschle, T.; Murgott, J.; Kirschning, C.; Rummel, C.; Gerstberger, R.; Roth, J. (2012): Fever induction by systemic stimulation with macrophage-activating lipopeptide-2 depends upon TLR2 but not CD36. *Innate immunity* 18 (3), S. 541–559.

Wilhelms, D. B.; Kirilov, M.; Mirrasekhian, E.; Eskilsson, A.; Kugelberg, U. Ö.; Klar, C. et al. (2014): Deletion of prostaglandin E2 synthesizing enzymes in brain endothelial cells attenuates inflammatory fever. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 34 (35), S. 11684–11690.

Williams, J. W.; Rudy, T. A.; Yaksh, T. L.; Viswanathan, C. T. (1977): An extensive exploration of the rat brain for sites mediating prostaglandin-induced hyperthermia. *Brain research* 120 (2), S. 251–262.

Wu, C. C.; Croxtall, J. D.; Perretti, M.; Bryant, C. E.; Thiemermann, C.; Flower, R. J.; Vane, J. R. (1995): Lipocortin 1 mediates the inhibition by dexamethasone of the induction by endotoxin of nitric oxide synthase in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (8), S. 3473–3477.

Wuchert, F.; Ott, D.; Murgott, J.; Rafalzik, S.; Hitzel, N.; Roth, J.; Gerstberger, R. (2008): Rat area postrema microglial cells act as sensors for the toll-like receptor-4 agonist lipopolysaccharide. *J Neuroimmunol* 204 (1-2), S. 66–74.

Wuchert, F.; Ott, D.; Rafalzik, S.; Roth, J.; Gerstberger, R. (2009): Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta and nitric oxide induce calcium transients in distinct populations of cells cultured from the rat area postrema. *J Neuroimmunol* 206 (1-2), S. 44–51.

Yamagata, K.; Matsumura, K.; Inoue, W.; Shiraki, T.; Suzuki, K.; Yasuda, S. et al. (2001): Coexpression of microsomal-type prostaglandin E synthase with cyclooxygenase-2 in brain endothelial cells of rats during endotoxin-induced fever. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21 (8), S. 2669–2677.

Yoshida, K.; Li, X.; Cano, G.; Lazarus, M.; Saper, C. B. (2009): Parallel preoptic pathways for thermoregulation. *J. Neurosci.* 29 (38), S. 11954–11964.

Yoshida, K.; Nakamura, K.; Matsumura, K.; Kanosue, K.; Konig, M.; Thiel, H.-J. et al. (2003): Neurons of the rat preoptic area and the raphe pallidus nucleus innervating the brown adipose tissue express the prostaglandin E receptor subtype EP3. *The European journal of neuroscience* 18 (7), S. 1848–1860.

Zeisberger, E. (1999): From humoral fever to neuroimmunological control of fever. *Journal of Thermal Biology* 24 (5–6), S. 287–326.

Zhang, J.; Rivest, S. (2001): Anti-inflammatory effects of prostaglandin E2 in the central nervous system in response to brain injury and circulating lipopolysaccharide. *Journal of neurochemistry* 76 (3), S. 855–864.

Zhang, X.; Mak, S.; Li, L.; Parra, A.; Denlinger, B.; Belmonte, C.; McNaughton, P. A. (2012): Direct inhibition of the cold-activated TRPM8 ion channel by Gαq. *Nat. Cell Biol.* 14 (8), S. 851–858.

I. ANHANG

1. Danksagung

Ich möchte mich hiermit herzlich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Veterinär-Physiologie und –Biochemie für die wundervolle Zeit und die familiäre Atmosphäre bedanken.

Allen voran möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Joachim Roth für seine großartige Betreuung und stetige Unterstützung danken.

Prof. Dr. Rüdiger Gerstberger möchte ich für die Möglichkeit danken, diese Arbeit am Institut für Veterinär-Physiologie- und Biochemie anzufertigen.

PD Dr. Christoph Rummel möchte ich dafür danken, dass ich mir jederzeit fachlichen Rat bei ihm holen konnte.

Mein ganz besonders großer Dank gilt Daniela Ott für die hervorragende Einarbeitung in alle Labormethoden und die tägliche Unterstützung in allen Lebenslagen, welche weit über Kollegialität hinausging. Weiterhin möchte ich natürlich auch Jolanta Murgott und Doreen Marks für ihre Unterstützung bei der Laborarbeit danken.

Für die exzellente Betreuung der Versuchstiere möchte ich mich bei unseren Tierpflegern Michael Haas, Jan Rodrigues-Fonesca und Ralf Matheisl bedanken. Gerd Herber, Alexander Heinrich und Norbert Wagner möchte ich für die stetige Unterstützung bei technischen Problemen danken.

Meinen zwei- und vierbeinigen Kolleginnen und Kollegen Eric, Sandra, Anna, Jenny, Janne, Verena, Hanna, Sybille, Carmen, Anneke, Thomas, Sabine, Andor, Phoebe, Queeny und Kiwi möchte für die tolle Zeit auf und nach der Arbeit und den Freundschaften, die sich daraus entwickelt haben, ganz besonders danken. Ihr habt die Zeit zu etwas besonderem gemacht.

Meiner besten Freundin Nadine Lenz möchte ich dafür danken, dass sie alle Hoch- und Tiefphasen gemeinsam mit mir durchgestanden hat, immer für mich da war und mir Kraft gespendet hat.

Last, but not least, möchte ich ganz besonders meinen Eltern danken, ohne deren Unterstützung ich niemals so weit gekommen wäre.

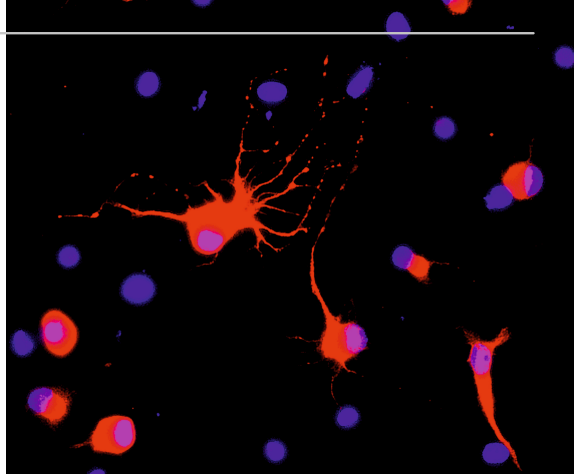
Danke!

2. Erklärung zur Dissertation

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.“

Ort, Datum

Unterschrift



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6525-6



9 783835 196525 6